

Tesis de Posgrado

Mecanismos inmunopatogénicos en la neuromiopatía chagásica experimental

Mirkin, Gerardo A.I.

1996

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Mirkin, Gerardo A.I.. (1996). Mecanismos inmunopatogénicos en la neuromiopatía chagásica experimental. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2865_Mirkin.pdf

Cita tipo Chicago:

Mirkin, Gerardo A.I.. "Mecanismos inmunopatogénicos en la neuromiopatía chagásica experimental". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1996. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2865_Mirkin.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
Y NATURALES**

**MECANISMOS INMUNOPATOGENICOS
EN LA NEUROMIOPATIA
CHAGASICA EXPERIMENTAL**

LIC. GERARDO A. I. MIRKIN

**TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR
DE LA UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

DIRECTORA: DRA. STELLA M. GONZALEZ CAPPA

**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

1996

42

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
Y NATURALES**

**IMMUNE PATHOGENIC MECHANISMS
IN EXPERIMENTAL CHAGASIC
NEUROMYOPATHY**

LIC. GERARDO A. I. MIRKIN

**THESIS FOR PURSUING A Ph. D. DEGREE
FROM THE
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

DIRECTOR: DRA. STELLA M. GONZALEZ CAPPA

**DEPARTAMENT OF MICROBIOLOGY
FACULTY OF MEDICINE
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

1996

A Silvia y a mis hijos, Cecilia y Federico.

Porque tuvieron la paciencia para soportar:

Mis llegadas tarde a casa y,

Mi (mal)humor cuando las cosas no salían;

y porque, sobre todo:

Los amo y,

No podría haber realizado este trabajo sin la alegría de estar junto a ellos.

A mis padres, Héctor y Dora, porque sí.

A mis hermanos, Daniel, Adrián y Rolando. ¿Por qué no?.

A quienes no alcanzaron a compartir este momento conmigo (Moisés, Abe, Perla, Jaime, Celia, Felipe, Aída), y están en mi memoria.

AGRADECIMIENTOS

A la Prof. Dra. Stella M. González Cappa, mi Directora de Tesis, por confiar en que algún día terminaría de escribirla.

A mis compañeras Valeria Sonia y María Elisa, por darme un respiro afectivo e intelectual para realizar esta Tesis.

A mis compañeras Ana María Luisa Micaela y María Susana, por su apoyo en el desarrollo de esta Tesis.

A la Dra. Elvira Luisa Durante de Isola y a la Bioq. Estela Lammel, por compartir muchos de los sinsabores, frustraciones y alegrías que depara la dura vida del científico.

Al personal técnico y administrativo del laboratorio, por su colaboración, a pesar que muchas veces no sabían lo que se estaba «cocinando» en el laboratorio.

Al Programa de Becas de Universidad de Buenos Aires, por otorgarme las Becas de Investigación para Graduados que me permitieron realizar parte de esta Tesis.

Al Programa de las Naciones Unidas para la Investigación y Entrenamiento en Enfermedades Tropicales (TDR) por otorgar a la Dra. González Cappa un subsidio relacionado con el tema de esta Tesis.

A los Dres. Olga P. Sanz, Roberto E.P. Sica y Roberto Rey de la División Neurología del Hospital Municipal «J. Ramos Mejía», por la realización de los estudios electromiográficos, a la Dra. Marta Jones (Sector Neuropatología, Servicio de Patología del Hospital de Niños de La Plata), por su colaboración en los estudios histopatológicos y al Dr. Emilio Malchiodi, IDEHU, por la realización de las PCR. A todos ellos, por sus muchas demostraciones de afecto.

Los resultados presentados en esta Tesis fueron parcialmente publicados en:

Mirkin GA, Jones M, Sanz OP, Rey R, Sica REP, González Cappa SM. 1994. Experimental Chagas' disease: electrophysiology and cell composition of the neuromyopathic inflammatory lesions in mice infected with a myotropic and a pantropic strain of *Trypanosoma cruzi*. Clin. Immunol. Immunopathol. 73:69-79.

González Cappa SM, **Mirkin G**. 1994. Peripheral nervous system alterations in murine model of Chagas' disease. En: *Trypanosoma cruzi* and the nervous system. PAHO/WHO Scientific Publication No. 537, cap. 18, pg. 317-334.

Sica REP, González Cappa SM, Sanz OP, **Mirkin G**. 1995. Peripheral nervous system involvement in human and experimental chronic American trypanosomiasis. Bull. Soc. Path. Ex. (France) 88: 156-163.

Mirkin GA, Celentano AM, Sanz OP, Jones M, Sica REP, González Cappa SM. Different *Trypanosoma cruzi* strains promote neuromyopathic damage mediated by distinct T lymphocyte subsets. Clin. Exp. Immunol. (En prensa).

Otras publicaciones del autor:

Losavio A, Jones M, Sanz OP, **Mirkin G**, Gonzalez Cappa SM, Muchnik S, Sica REP. 1989. A sequential study of the peripheral nervous system involvement in Experimental Chagas' disease. Am. J. Trop. Med. and Hyg. 41: 539-547.

Levi Yeyati P, Bonnefoy S, **Mirkin G**, Debrabant A, Lafon S, Panebra A, González Cappa E, Dedet J-P, Hontebeyrie-Joskowicz M, Levin M. 1991. The 70-kDa heat-shock protein is a major antigenic determinant in human *Trypanosoma cruzi*/*Leishmania braziliensis braziliensis* mixed infection. Immunol. Lett. 31: 27-34.

Losavio AS, Sica REP, Sanz OP, **Mirkin G**, González Cappa SM, Muchnik S. 1993. Functional changes of the sciatic nerve in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. Medicina (Buenos Aires) 53: 129-132.

Tekiel VS, **Mirkin GA**, González Cappa SM. Specific reactivity against homologous tissue is induced by different strains of Trypanosoma cruzi in a murine model of Chagas' disease. Remitido para su publicación . (Remitido para su publicación).

INDICE

ABREVIATURAS	vii
RESUMEN	ix
INTRODUCCION	1
I. EL AGENTE ETIOLOGICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS	1
I.A. <u>POSICION TAXONOMICA</u>	1
I.B. <u>CICLO BIOLOGICO</u>	1
II. HETEROGENEIDAD DE LAS POBLACIONES PARASITARIAS	2
II.A. <u>VIRULENCIA</u>	3
II.B. <u>TROPISMO</u>	4
II.C. <u>INMUNOGENICIDAD</u>	4
III. RESISTENCIA DEL HUESPED	5
III.A. <u>RESISTENCIA NATURAL</u>	6
III.B. <u>RESPUESTA INMUNE</u>	7
III.B.1. <u>MECANISMOS INESPECIFICOS</u>	7
III.B.2. <u>MECANISMOS ESPECIFICOS</u>	8
III.B.2.a. <u>Papel de los fagocitos mononucleares</u>	8
III.B.2.b. <u>Señales de activación</u>	8
III.B.2.c. <u>Linfocitos B, plasmocitos y producción de inmunoglobulinas</u>	9
III.B.2.d. <u>Linfocitos T</u>	10

IV. PATOLOGIA, CLINICA Y PATOGENIA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS	11
IV.A. <u>PATOLOGIA</u>	11
IV.A.1. <i>CORAZON Y SISTEMA CARDIOVASCULAR</i>	11
IV.A.2. <i>SISTEMA NERVIOSO AUTONOMO</i>	12
IV.A.3. <i>SISTEMA NERVIOSO PERIFERICO</i>	12
IV.B. <u>CLINICA</u>	13
IV.C. <u>PATOGENIA</u>	13
IV.C.1. <i>MECANISMOS PATOGENICOS DEPENDIENTES DEL PARASITO</i>	14
IV.C.2. <i>MECANISMOS PATOGENICOS DEPENDIENTES DE LA RESPUESTA INMUNE</i>	15
OBJETIVOS	18
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	19
MATERIALES Y METODOS	20
I. GENERALES	20
I.A. <u>ANIMALES</u>	20
I.B. <u>MANTENIMIENTO DE LAS CEPAS DE T CRUZI</u>	20
I.C. <u>INFECCION DE LOS RATONES EXPERIMENTALES</u>	20
I.D. <u>DETECCION Y CUANTIFICACION DE LA PARASITEMIA</u>	21
I.E. <u>TRATAMIENTO FARMACOLOGICO</u>	21

II. ESTUDIOS ELECTROMIOGRAFICOS (EMG)	21
III. ESTUDIOS HISTOLOGICOS E INMUNOHISTOQUIMICOS	22
III.A. <u>OBTENCION Y PRESERVACION DE LAS MUESTRAS DE TEJIDO</u>	22
III.B. <u>ESTUDIOS HISTOLOGICOS</u>	22
III.C. <u>ESTUDIOS INMUNOHISTOQUIMICOS (IHQ)</u>	22
III.C.1. <i>ANTICUERPOS Y CONJUGADOS EMPLEADOS EN IHQ</i>	23
III.C.1.a. <u>Inmunofluorescencia</u>	23
III.C.1.b. <u>Biotina/Avidina-Peroxidasa (BAP)</u>	24
III.C.1.c. <u>Titulación de los Ac</u>	24
III.C.2. <i>INMUNOMARCACION</i>	25
III.C.2.a. <u>Inmunofluorescencia directa</u>	25
III.C.2.b. <u>Inmunofluorescencia indirecta</u>	25
III.C.2.c. <u>BAP</u>	25
III.C.3. <i>CUANTIFICACION DE LAS POBLACIONES CELULARES</i>	26
IV. ESTUDIOS DE INFECCION CON BAJAS DOSIS DE PARASITOS	26
V. ESPECIFICIDAD ANTIGENICA DE LAS SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T	27
V.A. <u>PURIFICACION DE SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T</u>	27
V.A.1. <i>OBTENCIÓN DE CELULAS MONONUCLEARES</i>	27
V.A.2. <i>DEPLECION DE MACROFAGOS</i>	27
V.A.3. <i>ANALISIS DE LAS CELULAS NO-ADHERENTES</i>	28
V.A.4. <i>DEPLECION DE LINFOCITOS B</i>	28

V.A.5. ANALISIS DE LA EFICIENCIA DE DEPLECION DE LINFOCITOS B	29
V.A.6. SELECCION DE LT COOPERADORES (CD4+) Y LT CITOTOXICOS (CD8+)	29
V.A.7. ANALISIS DEL FENOTIPO SELECCIONADO	29
V.B. <u>ESTUDIOS DE PROLIFERACION LINFOCITARIA</u>	30
V.B.1. <u>TEJIDOS</u>	30
V.B.1.a. <u>Obtención de Antígenos (Ag)</u>	30
V.B.1.b. <u>Concentración proteica de las preparaciones antigénicas</u>	30
V.B.2. <u>ENSAYOS DE PROLIFERACION</u>	30
V.B.2.a. <u>Células efectoras</u>	30
V.B.2.b. <u>Células presentadoras de Ag</u>	30
V.B.2.c. <u>Estimulación</u>	31
V.B.2.d. <u>Pulso de ³H-Timidina</u>	31
VI. ESTUDIOS DE TRANSFERENCIA PASIVA DE SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T	31
VI.A. <u>TRANSFERENCIA DE CELULAS</u>	32
VI.B. <u>CONTROLES DE CO-INFECCION</u>	32
VI.B.1. <u>DETECCION DE INFECCION EN RATONES LACTANTES</u>	32
VI.B.2. <u>DETECCION DE ADN DE T. CRUZI</u>	32
VI.B.2.a. <u>Purificación del ADN total</u>	32
VI.B.2.b. <u>Amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</u>	33
VI.B.2.c. <u>Análisis de los amplicones</u>	33
RESULTADOS	34
I. ESTUDIOS DE INFECCION EN RATONES C3H/HeN	34

I.A. <u>INFECTADOS CON LA CEPA CA-I</u>	34
I.A.1. <i>ELECTROMIOGRAFIA</i>	34
I.A.2. <i>HISTOLOGIA</i>	35
I.A.2. a. <u>Músculo isquiotibial</u>	35
I.A.2. b. <u>Nervio ciático</u>	35
I.A.2. c. <u>Médula espinal</u>	35
I.A.3. <i>INMUNOHISTOQUIMICA</i>	35
I.A.3.a. <u>Músculo isquiotibial</u>	35
I.A.3.b. <u>Nervio ciático</u>	36
I.A.3.c. <u>Médula espinal</u>	36
I.B. <u>INFECTADOS CON LA CEPA RA</u>	36
I.B.1. <i>ELECTROMIOGRAFIA</i>	37
I.B.2. <i>HISTOLOGIA</i>	37
I.B.2.a. <u>Músculo isquiotibial</u>	37
I.B.2.b. <u>Nervio ciático</u>	37
I.B.2.c. <u>Médula espinal</u>	37
I.B.3. <i>INMUNOHISTOQUIMICA</i>	38
I.B.3.a. <u>Músculo isquiotibial</u>	38
I.B.3.b. <u>Nervio ciático</u>	38
I.B.3.c. <u>Médula espinal</u>	38
II. ESTUDIOS DE PROLIFERACION LINFOCITARIA	38
II.A. <u>DETERMINACION DE LA DOSIS DE MITOMICINA C</u> <u>INHIBITORIA DE LA PROLIFERACION</u>	39
II.B. <u>PROLIFERACION DE LINFOCITOS T DE RATONES</u> <u>INFECTADOS CON K-98</u>	39
II.B.1. <i>LINFOCITOS T CD4</i>	39

II.B.2. <i>LINFOCITOS T CD8</i>	39
II.C. <u>PROLIFERACION DE LINFOCITOS T DE RATONES</u> <u>INFECTADOS CON RA</u>	39
II.C.1. <i>LINFOCITOS T CD4</i>	39
II.C.2. <i>LINFOCITOS T CD8</i>	39
II.D. <u>LA PROLIFERACION DE LOS LINFOCITOS T FRENTE A AG</u> <u>PROPIOS OCURRE COMO CONSECUENCIA DE LA INFECCION</u>	40
III. DOSIS MINIMA DE PARASITOS RESPONSABLE DE LA PRODUCCION DE LESIONES	40
III.A. <u>PARASITEMIA</u>	40
III.B. <u>SEROLOGIA</u>	41
III.C. <u>HISTOPATOLOGÍA</u>	41
IV. ESTUDIOS DE TRANSFERENCIA PASIVA	42
IV.A. <u>TRANSFERENCIA DE LINFOCITOS DE RATONES</u> <u>INFECTADOS CON K-98</u>	42
IV.A.1. <i>LINFOCITOS T CD4</i>	42
IV.A.1.a. <u>Histopatología</u>	42
IV.A.1.b. <u>Inmunohistoquímica</u>	42
IV.A.2. <i>LINFOCITOS T CD8</i>	43
IV.A.2.a. <u>Histopatología</u>	43
IV.B. <u>TRANSFERENCIA DE LINFOCITOS</u> <u>DE RATONES INFECTADOS CON RA</u>	43
IV.B.1. <i>LINFOCITOS T CD4</i>	43

IV.B.1.a. <u>Histopatología</u>	43
IV.B.1.b. <u>Inmunohistoquímica</u>	43
IV.B.2. <i>LINFOCITOS T CD8</i>	44
IV.A.2.a. <u>Histopatología</u>	44
IV.B.2.b. <u>Inmunohistoquímica</u>	44
IV.C. <u>CONTROLES DE CO-INFECCION ACCIDENTAL</u> <u>EN LOS RECEPTORES DE LINFOCITOS</u>	44
IV.C.1. <i>ESTUDIOS PARASITOLÓGICOS</i>	44
IV.C.1.a. <u>Convencionales</u>	44
IV.C.1.b. <u>PCR</u>	45
IV.C.2. <i>ESTUDIOS SEROLÓGICOS</i>	45
DISCUSION	46
CONCLUSIONES	56
DIRECCIONES FUTURAS	57
BIBLIOGRAFIA	58

ABREVIATURAS

Ac:	anticuerpo(s)
AcMo:	anticuerpo(s) monoclonal(es)
AD:	aglutinación directa
ADN:	ácido desoxirribonucleico
Ag:	antígeno(s)
ASB:	albúmina sérica bovina
C3H:	raton(es) C3H/HeN
CA:	células accesorias
CCDA:	citotoxicidad celular dependiente de Ac
CMH:	complejo mayor de histocompatibilidad
ConA:	concanavalina A
CPA:	célula(s) presentadora(s) de Ag
cpm:	cuentas por minuto
dpm:	desintegraciones por minuto
EDTA:	ácido etilendiaminotetraacético
EMG:	electromio(gráfico/grafia/grama)
Fc:	fragmento cristizable de las Ig obtenido por digestión papáinica
FITC:	isotiocianato de fluoresceína
GM1:	gangliósido M1
H&E:	hematoxilina de Mayer/eosina
hr:	hora(s)
IFD:	inmunofluorescencia directa
IFI:	inmunofluorescencia indirecta
IFN:	interferón
Ig:	inmunoglobulina(s)
IHQ:	inmunohistoquímica(s)
IL:	interleuquina
ip:	intraperitoneal
iv:	intravenosa
LAB:	biotina/avidina indirecta
LT:	linfocito(s) T
MHT:	microhematocrito
min:	minuto(s)
MitC:	mitomicina C
NK	células asesinas naturales

NTP:	nucleósido(s) trifosfato
PBS:	solución salina tamponada con fosfatos
PCR:	reacción en cadena de la polimerasa
pi:	post-infección
POPOP:	1,4-bis(5-feniloxazol-2-il)benceno
PPO:	2,5-difeniloxazol
pt:	post-transferencia
PUM:	potencial(es) de unidad motora
SDS:	dodecilsulfato de sodio
sIg:	inmunoglobulina de superficie
SNA:	sistema nervioso autónomo
SNP:	sistema nervioso periférico
TBS:	solución salina tamponada con trishidroximetil-aminometano
TdR:	desoxirribósido de timidina
TNF:	factor de necrosis tumoral
TS:	tripomastigote(s) sanguíneo(s)

RESUMEN

Los mecanismos patogénicos subyacentes a las alteraciones neuromusculares producidas durante la infección con Trypanosoma cruzi fueron estudiados en un modelo murino empleando una cepa mitotrópica de escasa virulencia (CA-I) y una cepa letal pantrópica (RA), mediante técnicas electrofisiológicas, histológicas e inmunológicas.

Ratones C3H/HeN infectados la cepa CA-I manifestaron un patrón electromiográfico de compromiso muscular primario, en tanto los infectados con RA, revelaron un patrón neuropático primario. Los estudios histopatológicos evidenciaron alteraciones inflamatorias de severidad creciente en los tejidos afectados estudiados en este modelo: músculo isquiotibial, nervio ciático y médula espinal. Las lesiones musculares eran de mayor intensidad en la infección con CA-I y las de tejido nervioso predominaban con RA, lo cual está de acuerdo con el tropismo parasitario.

El fenotipo celular predominante en los infiltrados inflamatorios dependió de la cepa de *T. cruzi*, del tejido y del tiempo post-infección. Los rasgos más destacados en la infección con la cepa CA-I fueron: a) Predominio de linfocitos T CD4 en músculo esquelético durante la fase aguda y crónica temprana y, b) Presencia de linfocitos B con IgM de superficie en la fase crónica tardía en todos los tejidos. Las características más relevantes de la infección con RA fueron: a) predominio de linfocitos T CD8 en tejido nervioso durante todo el curso de la infección, b) presencia de células NK (asialo-GM1+) en tejido muscular durante la fase crónica y, c) presencia células CD4⁺, CD8⁺ en tejido nervioso durante la fase crónica.

Estudios de proliferación linfocitaria realizados durante la infección crónica con el clon K-98 de CA-I demostraron la existencia de linfocitos T CD4 y CD8 autorreactivos frente a Ag de tejido muscular esquelético y sistema nervioso. En estudios similares con la cepa RA ambas subpoblaciones de linfocitos T sólo proliferaron frente a Ag de SN.

La transferencia pasiva de linfocitos T CD4 de ratones infectados con K-98, indujo miositis con predominio de células T CD4⁺ y macrófagos en ratones singéneos normales, sugiriendo el desarrollo de hipersensibilidad retardada (HR), frente a Ag musculares. Los linfocitos T CD8 de los mismos ratones no desencadenaron patología neuromuscular en los receptores. La transferencia de linfocitos T CD4 y CD8 de ratones infectados con RA, indujo neuritis y leptomeningitis, sugiriendo el desarrollo de mecanismos de HR como de citotoxicidad dependiente de linfocitos T frente a Ag de sistema nervioso.

ABSTRACT

The pathogenic mechanisms underlying the neuromuscular alterations during Trypanosoma cruzi infection were studied in a murine model by means of electrophysiological, histological and immunological techniques in inbred mice infected with a low virulence myotropic strain (CA-I) and a highly virulent pantropic strain by means of electrofisiological, histological and immunological techniques.

C3H/HeN mice infected with CA-I showed an electromyographic pattern of primary muscle compromise while those infected with RA disclosed a primary neuropathic pattern. Histological studies revealed inflammation of increasing severity in the affected tissues studied in this model: hamstring muscle, sciatic nerve and spinal cord. The muscle lesions were more intense in mice infected with CA-I, and those in nervous tissue were more intense in mice infected with RA in agreement with the parasite tropism.

The predominant phenotype in the inflammatory infiltrates depended on the T.cruzi strain, the tissue and post-infection time studied. The relevant features in the infection with CA-I were: a) Predominance of CD4 T lymphocytes in skeletal muscle during the acute and early chronic phases and, b) Presence of surface IgM positive B lymphocytes during the late chronic phase in all tissues. The relevant features in the infection with RA were: a) Predominance of CD8 T lymphocytes in nervous tissue during the course of infection, b) Presencia of NK cells (asialo-GM1+) in muscle tissue during the chronic phase and, c) Presence of CD4⁺, CD8⁺ cells in nervous tissue during the chronic phase.

Lymphocyte proliferation studies performed during the chronic phase with the K-98 clone of CA-I showed the existence of nervous system Ag and muscle Ag autoreactive CD4 and CD8 T lymphocytes. In similar studies with the RA strain both T cell subsets proliferated against nervous tissue Ag only.

Passive cell transfer of CD4 T lymphocytes from K-98-infected mice, induced myositis with predominance of CD4 T cells and macrophages in normal syngeneic mice, suggesting the development of delayed-type hypersensitivity (DTH) against muscle Ag. CD8 T lymphocytes from the same donors did not develop neuromuscular pathology in recipients. The transfer of CD4 and CD8 T lymphocytes from RA-infected mice induced neuritis and leptomeningitis in recipients, suggesting the development of both DTH and T lymphocyte-dependent cytotoxicity against nervous system Ag.

INTRODUCCION

I. EL AGENTE ETIOLOGICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

I.A. POSICION TAXONOMICA

El Trypanosoma cruzi (T.cruzi), agente causal de la enfermedad de Chagas, es un protozoo flagelado perteneciente al Orden Kinetoplastida. Los miembros de este grupo, entre los que se incluye al género Leishmania, se caracterizan por la presencia de un flagelo anterior bien desarrollado en los estadios extracelulares, y de una estructura denominada kinetoplasto (Lee y Hutner, 1985). Este contiene aproximadamente 20% del total de ADN (De Souza W., 1984), muestra continuidad estructural con una mitocondria de grandes dimensiones -el mitocondrion- y está asociado al cinetosoma y al cuerpo parabasal (Lewis, 1975).

El parásito presenta diversos estadios, cuyos nombres hacen referencia a la presencia o ausencia de un flagelo conspicuo que emerge por el extremo anterior del soma y a la localización relativa del kinetoplasto con respecto al núcleo. Los esferomastigotes presentan un largo flagelo rodeando el soma. En los epimastigotes el kinetoplasto es anterior al núcleo y el flagelo es libre en casi toda su extensión. Los tripomastigotes presentan el núcleo en posición media, por delante del kinetoplasto. El flagelo que se origina en el extremo posterior del soma, lo bordea formando una membrana ondulante para emerger libre en el extremo anterior. Los amastigotes tienen un flagelo poco aparente, que no emerge del saco flagelar. Este es un pliegue de la membrana que rodea al cinetosoma, a través del cual emerge el flagelo en los otros estadios y que está involucrado en la internalización de macromoléculas del huésped (Webster y Russell, 1993), incluyendo pequeñas cantidades de anticuerpos específicos (Teixeira y Martins Santana, 1989).

I.B. CICLO BIOLOGICO

El T.cruzi tiene un ciclo heteroxeno en el cual diversas especies de mamíferos se comportan como huéspedes definitivos, en tanto que distintas especies de hemípteros de la Familia Reduviidae se comportan como vectores y huéspedes intermediarios. En el intestino medio de estos últimos se multiplican por fisión binaria las formas esferomastigote y epimastigote. Este último estadio progresa y se multiplica en el intestino posterior dando origen por diferenciación a los tripomastigotes metacíclicos, o formas infectantes, que no se multiplican y se localizan en la ampolla rectal. En el mamífero existen dos estadios, el tripomastigote circulante y el amastigote,

que corresponden a las formas de diseminación sanguínea y de multiplicación intracelular en los tejidos, respectivamente. Luego de picar a un mamífero para alimentarse, el vector infectado deposita en la piel las heces que contienen los tripomastigotes metacíclicos infectantes (Fife Jr., 1977).

Luego de ingresar a las primeras células blanco -células dendríticas de la piel y fibroblastos del tejido subcutáneo- el parásito escapa de la vacuola parasitófora al citoplasma, donde se multiplica como amastigote (González Cappa e Isola, 1994). Después de un número de duplicaciones genéticamente determinado (revisado por Dvorak, 1975) se lisan las células liberándose tripomastigotes hacia el torrente circulatorio. Se inicia así la diseminación sanguínea y hacia los ganglios linfáticos regionales. Durante la diseminación hemática los tripomastigotes atraviesan los capilares sanguíneos hacia los tejidos e invaden, fundamentalmente, células de músculo esquelético y cardíaco -miocitos y fibroblastos- y de linaje fagocítico mononuclear en hígado, bazo, sistema nervioso y otros tejidos, además de células no fagocíticas como los adipocitos en diversos tejidos. El ciclo se cierra cuando un insecto vector no infectado succiona sangre de un mamífero infectado. La infección del vector es tanto más probable cuanto mayor sea la parasitemia del huésped definitivo al momento de acontecer la picadura. Por esta razón, los perros que presentan parasitemias persistentemente elevadas actúan como reservorios eficientes en áreas endémicas (Gürtler, 1987). Además del nivel de parasitemia del huésped definitivo otros factores como las diferentes características genéticas de especies y diferencias fisiológicas de los estadios de desarrollo del vector, parecen tener un papel importante para su infección (García y Azambuja, 1991).

II. HETEROGENEIDAD DE LAS POBLACIONES PARASITARIAS

La especie T.cruzi está constituida por poblaciones con diferencias morfológicas y genéticas que han sido relacionadas con distintas características biológicas, como por ejemplo, tropismo, virulencia e inmunogenicidad en el mamífero, y progresión de la infección en el insecto vector. Si bien las poblaciones de T.cruzi son relativamente estables en lo que a comportamiento biológico se refiere, se ha demostrado que su composición es policlonal (Tibayrenc y col., 1986).

Se ha observado que clones derivados de una misma población exhiben diferente virulencia e histotropismo en ratones de alta (Postan y col., 1983) y baja susceptibilidad a la infección (Postan y col., 1984). Por lo tanto, el comportamiento biológico de un aislamiento dependerá del balance clonal dentro de la población. Este balance estará sujeto a la presión

selectiva por la capacidad del huésped de desarrollar una respuesta inmune clon-específica, la que dependerá, a su vez, de la inmunogenicidad del clon y de factores genéticos del huésped (Ver Sección III: Resistencia del huésped).

II.A. VIRULENCIA

En general se ha observado que la virulencia o capacidad letal de una población o clon parasitarios de T.cruzi está vinculada al tropismo tisular y a la capacidad de multiplicación intracelular. En modelos murinos, los clones o aislamientos que se multiplican activamente en células del sistema mononuclear fagocítico, generalmente dan lugar a parasitemias más elevadas y a mayores tasas de mortalidad que los que lo hacen en tejido muscular (Melo y Brener, 1978). La presencia de receptores específicos para los componentes tisulares es de particular importancia al considerar la virulencia de las poblaciones parasitarias, ya que de la capacidad de invasión tisular y de su especificidad derivarían las consecuencias patológicas.

Actualmente se conoce una gran variedad de factores de virulencia, algunos de los cuales son proteínas. Estas pueden ser receptores para componentes tisulares o enzimas que facilitan la penetración y el establecimiento del parásito en la célula huésped. Ortega-Barria y Pereira (1991) demostraron que la penetración de T.cruzi en células no fagocíticas está vinculada con la presencia, en la membrana del parásito, de proteínas con capacidad de unión para heparanos y colágenos y laminina, macromoléculas presentes en la membrana basal y en la matriz intersiticial tisular. La trans-sialidasa es una enzima involucrada en la transferencia de restos de ácido N-acetilneuramínico desde glicoconjugados del huésped a glicoproteínas parasitarias (Schenkman y col., 1991), una de las cuales es la penetrina (PM 60 kDa), descrita por Ortega-Barria y Pereira (1991), cuyo ligando sería el heparán sulfato, rico en ácido siálico (Herrera y col., 1994). Células CHO mutantes (Lec 2) que expresan escaso ácido siálico en sus membranas son infectadas en menor proporción que sus contrapartidas salvajes (Schenkman y col., 1993). La neutralización de la enzima mediante anticuerpos específicos aumenta la infectividad de los tripomastigotes in vitro (Cavallesco y Pereira, 1988; revisado por Schenkman y Eichinger, 1993). Estos estudios demuestran que la enzima es capaz de modular la invasión celular regulando la traslocación de restos de ácido siálico de glicoproteínas de la célula huésped a proteínas parasitarias (revisado por Schenkman y Eichinger, 1993). Algunos autores comunican que la unión a las glicoproteínas de la célula huésped ocurre a través de los restos glicosídicos (Bonay y Fresno, 1995), en tanto otros señalan la independencia entre la capacidad de unión y la presencia de hidratos de carbono en el receptor del parásito o el ligando de la célula huésped (Giordano y col., 1994). Aparte de los receptores parasitarios específicos para ligandos tisulares, la activación de ciertos receptores celulares asociados al desencadenamiento de señales intracelulares, por ejemplo

los receptores I y II para TGF- β , estaría involucrada en la penetración y multiplicación parasitaria ya que los tripomastigotes son capaces de adherirse a células mutantes que no los expresan pero son incapaces de penetrar o multiplicarse en las mismas (Ming y col., 1995).

II.B. TROPISMO

En los estudios experimentales con distintos aislamientos parasitarios, generalmente llevados a cabo en ratones, se ha descrito parasitismo tisular en diferentes órganos y tejidos del huésped. Las localizaciones más frecuentes de los amastigotes son: a) el músculo -cardíaco y esquelético- en los que los parásitos se localizan en miocitos, adipocitos y fibroblastos, b) el hígado y el bazo, en los que los parásitos invaden células del sistema fagocítico mononuclear y, c) sistema nervioso -periférico o central- en los cuales las células parasitadas son fibroblastos, células de Schwann o de la glía (Amaral y col., 1975; Melo y Brener, 1978; Postan y col., 1983; Molina y Kierszenbaum, 1988; Andrade y Rocha Silva, 1995).

El tropismo también está definido por variables fisiológicas celulares. Por ejemplo, se ha comunicado que las fibras musculares tipo I (de contracción lenta) se infectan predominantemente en relación a las de tipo II (Teixeira y Dvorak, 1985). En humanos, Antunes Teixeira y col. (1994) han descrito parasitismo de la vena central de las glándulas suprarrenales. Según los autores esta localización podría actuar de reservorio parasitario, debido a la inmunosupresión local asociada a la producción de corticosteroides que inhibirían mecanismos efectores inmunológicos de destrucción parasitaria.

De acuerdo con los patrones de tropismo tisular en ratones, se ha convenido en distinguir poblaciones o cepas miotrópicas y reticulotrópicas (macrofagotropas), en función de los tejidos predominantemente invadidos: muscular o reticuloendotelial. Así, las cepas CA-I y CL son predominantemente miotrópicas para el ratón, en tanto Tulahuén e Y han sido descritas como primariamente reticulotrópicas (Taliaferro y Pizzi, 1955; Melo y Brener, 1978; González Cappa y col., 1980, 1981). En el caso de estas últimas y de otras cepas como Sylvio (Postan y col., 1983) y RA (Mirkin y col., 1994), además de encontrarlas en células de linaje monocítico, es frecuente hallarlas en otros tejidos, por lo que la definición de éstas como pantrópicas sería más adecuada (Mirkin y col., 1994).

II.C. INMUNOGENICIDAD

Diferencias en la inmunogenicidad de diversas poblaciones de *T. cruzi*, se establecieron al observar que ratones exocriados o conejos infectados desarrollan distintos patrones de respuesta

humoral (producción de anticuerpos líticos, opsonizantes y neutralizantes) (Vattuone y col., 1974; Krettli y col., 1979; Sánchez y González Cappa, 1983; Müller y González Cappa, 1987; Celentano y González Cappa, 1992) y celular (Vattuone y col., 1974).

La diferente inmunogenicidad de las poblaciones de *T.cruzi* podría depender de múltiples factores como la inmunodominancia de ciertos epitopes (Martins y col., 1985; Israelski y col., 1988) y/o el enmascaramiento estructural y funcional de otros mediante la incorporación de ácido siálico (revisado por Schenkman y Eichinger, 1993). Por ejemplo, la presencia de ácido siálico en las membranas celulares es un potente inhibidor de la lisis mediada por la vía alterna del complemento (Kazatchkine y col., 1979).

III. RESISTENCIA DEL HUESPED

Lo mencionado en la sección anterior señala que, al evaluar resistencia a la infección, se deben considerar las características biológicas del parásito así como los mecanismos desarrollados por el huésped para limitar la parasitosis. Muchos de estos mecanismos están relacionados con las características genéticas del huésped, por lo que la expresión final de la virulencia y/o patogenicidad de las cepas depende de un balance entre la expresión por parte del parásito de los mecanismos de invasión celular, multiplicación y evasión de la respuesta inmune, así como de los mecanismos de resistencia natural y específica del huésped.

Como se indicó en el apartado anterior, la virulencia como expresión de la capacidad del parásito de producir patología, no puede desvincularse de la variación intrínseca que muestran distintas especies animales, en cuanto a la resistencia o susceptibilidad a la infección. Se ha observado que la misma población de *T.cruzi* exhibe distinta virulencia dependiendo de la asociación huésped-parásito considerada. En este sentido se han descrito diferencias en resistencia, niveles de parasitemia y producción de patología entre distintas especies de mamíferos de laboratorio como ratones (Laguens y col., 1980), ratas (Scorza y Scorza, 1972), conejos (Chiari y col., 1980), perros (Andrade, 1984) y monos (Bonecini-Almeida y col., 1990). En el marco de estos experimentos la resistencia a la infección no debe entenderse en términos absolutos, sino relativos al tiempo de sobrevivencia de los animales infectados, ya que todas las especies mencionadas son susceptibles a la infección. Por otra parte, la posibilidad de establecer una infección en los modelos experimentales depende de factores como la edad y el sexo del huésped y del tamaño del inóculo. En este último caso el análisis comparativo de la susceptibilidad de diferentes especies es difícil de llevar a cabo, ya que las dosis infectantes raramente se expresan por unidad de masa corporal del animal inoculado en los estudios realizados.

Los modelos murinos aportan la mayor parte de la información relativa a mecanismos de resistencia por el conocimiento que se posee en relación a los aspectos genéticos vinculados

con las respuestas innata y adquirida. Ratones con diferente constitución genética muestran una notoria diversidad en cuanto a la susceptibilidad a la infección (Trischmann y col., 1978). En estos animales se ha demostrado que genes tanto asociados al CMH como no asociados al mismo, están involucrados en el control de la parasitemia y determinan la capacidad de sobrevivir (Trischmann y Bloom, 1982; Wrightsman y col., 1982).

Las observaciones de esta sección y de la precedente señalan la complejidad de la interacción entre el *T. cruzi* y el huésped, de cuyo balance dependerá el curso de la infección y el posible desencadenamiento de la patología.

III.A. RESISTENCIA NATURAL

Los mecanismos de resistencia natural están relacionados con la presencia de barreras estructurales y fisiológicas que limitan o impiden el acceso de patógenos al organismo. Diversas características como la especie animal, edad y sexo involucradas en la resistencia o susceptibilidad a la infección, pueden estar vinculadas a la integridad y desarrollo de las barreras mencionadas. En relación a las diferencias de susceptibilidad de distintas especies, se ha observado, por ejemplo, que las aves son refractarias a la infección. El mecanismo asociado a la resistencia estaría relacionado con la activación eficiente del complemento por la vía alterna (Kierszenbaum y col., 1976), así como con la elevada temperatura corporal de las aves, ya que los amastigotes se multiplican más lentamente a altas temperaturas (Neva y col., 1961). Por el contrario, todos los mamíferos estudiados hasta el momento pueden infectarse, si bien las características de la infección dependen de la especie, como se señaló previamente. Con respecto a la edad también se observan variaciones; como es de esperar, los animales lactantes o recién destetados suelen ser más susceptibles que los adultos, desarrollando mayores parasitemias y tasas de mortalidad. También se han observado diferencias al comparar la susceptibilidad a la infección entre machos y hembras de una misma especie. Ya en la década del '40 Hauschka (1947) estableció que los machos de ratones endocriados (C3H y DBA) manifiestan mayor susceptibilidad que las hembras.

Si bien la resistencia natural es relativamente eficaz para la limitación de la infección, en las especies susceptibles el mecanismo principal que restringe la diseminación parasitaria es la respuesta inmune.

III.B. RESPUESTA INMUNE

El sistema inmune de los vertebrados se originó como un mecanismo con capacidad para el reconocimiento de lo propio y lo extraño, lo que permitió mantener la individualidad de la especie frente patógenos potenciales. Los mecanismos más primitivos, presentes en taxones invertebrados, corresponden al desarrollo de células sin especificidad alguna, dedicadas a la fagocitosis. La aparición de mecanismos específicos de reconocimiento en los vertebrados, dio lugar a un control más adecuado de los agentes patógenos, a través de mecanismos de autorregulación de la magnitud de la respuesta frente a aquellos, así como por la capacidad de diferenciar, al menos en principio, al agente o el tejido infectado del tejido no infectado (revisado por Marchalonis y Schluter, 1994).

III.B.1. *MECANISMOS INESPECIFICOS*

Las células fagocíticas mononucleares o polimorfonucleares son la primera barrera de defensa que pone en marcha el sistema inmune, ante una infección de cualquier etiología. En particular, durante la fase aguda de las infecciones por *T.cruzi*, se ha descrito la presencia de ambos tipos de fagocitos asociados a los nidos de amastigotes y a células necróticas en las lesiones (Molina y Kierszenbaum, 1988; Ben Younes-Chenouffi y col., 1988). El grado de activación de los macrófagos es independiente de la población parasitaria infectante; tanto cepas altamente virulentas como cepas no letales producen niveles similares de estallido respiratorio, detectable mediante quimioluminiscencia, durante la fase aguda de la infección. Sin embargo, en este período distintas cepas de *T.cruzi* pueden inducir diferente funcionalidad microbiciada (Celentano y González Cappa, 1992). Una vez activadas, en una fase más avanzada de la infección, estas células se encargan tanto de destruir parásitos como de eliminar el debris celular resultante de la necrosis tisular.

La capacidad parasiticida aumentada de los macrófagos activados se ha relacionado con la producción de metabolitos del O_2 (Nathan y col., 1979) y óxido nítrico (Petry y col., 1994).

Al igual que las células de linaje mieloide/monocítico, existen células de linaje linfoide con capacidad de destruir parásitos de manera inespecífica: las células NK (natural killer o «asesinas naturales»). Ratones homocigotas para una mutación recesiva (bg/bg) que impide el desarrollo de estas células, tratados con un inductor (tilerona) de la producción de interferón (IFN) alfa (IFN- α) necesario para el desarrollo de las mismas, exhiben menor sobrevivencia que sus pares heterocigotas (+/bg) (James y col., 1982). Ensayos *in vitro* con células peritoneales de ratones tratados con ácido poliinosítico-policitidílico (otro inductor de interferón alfa) corroboran estas observaciones. En estos estudios se demostró que la actividad citotóxica contra

T.cruzi era dependiente de la presencia de células NK en la fracción celular no adherente, ya que el tratamiento con un anticuerpo monoclonal contra el marcador NK1.2 y complemento inhibía dicha actividad (Hatcher y Kuhn, 1982).

III.B.2. MECANISMOS ESPECÍFICOS

III.B.2.a. Papel de los fagocitos mononucleares: La actividad de las células fagocíticas de linaje mononuclear constituye, además de un mecanismo inespecífico de defensa, la primera etapa de activación de la respuesta inmune específica (Lu y Unanue, 1982). Las células de Langerhans, un tipo de células dendríticas derivadas de precursores de la médula ósea (Caux y col., 1995), son las encargadas de la captación, procesamiento y presentación de antígenos que ingresan por vía cutánea (revisado por King y Katz, 1990), asociada a la transmisión vectorial de T.cruzi. Estas células migran, vía los vasos linfáticos que drenan la piel, hacia los ganglios regionales transportando antígenos parasitarios (revisado por Knight y Stagg, 1993). Si bien no se ha descrito este mecanismo en la infección por T.cruzi, se ha comprobado que el mismo es funcional en las infecciones producidas por otras especies del Orden Kinetoplastida, Leishmania spp., que presentan una vía de infección vectorial similar (Moll y col., 1993). En los ganglios regionales tiene lugar la presentación antigénica, primera etapa para la activación de los linfocitos T cooperadores. El antígeno procesado por las células fagocíticas, asociado a moléculas de clase II del CMH, es presentado a los linfocitos T que poseen en su superficie receptores específicos para aquél (Morrison y col., 1986). En un estudio reciente se demostró la disminución en la capacidad para la captación, el procesamiento y la presentación antigénica por parte de los macrófagos peritoneales de ratones infectados con T.cruzi, si bien la expresión de moléculas de clase II no estaba alterada (Plasman y col., 1995).

III.B.2.b. Señales de activación: La activación de los linfocitos T específicos requiere la asociación del receptor T con las moléculas del CMH, que tienen unido el péptido antigénico (Acuto y col., 1983; Borst y col., 1983; revisado por Rammensee y col., 1993). En dicha activación, además, interviene un co-receptor (CD4) que se asocia a la porción no polimórfica del CMH clase II (revisado por Jenkins y Johnson, 1993). En el modelo murino de tripanosomiasis americana se ha descrito la disminución en la expresión del receptor T (Sztein y col., 1990; Sztein y Kierszenbaum, 1992), así como la modulación negativa de la expresión de CD4 (Sztein y col., 1990).

La unión entre estos componentes da lugar a una compleja red de señales intracelulares secundarias que determinarán la transcripción de ARN mensajeros (ARNm) de citoquinas, que promueven la proliferación y/o diferenciación celular de linfocitos T o B, así como el

desarrollo de colonias de células de linaje monocítico y/o granulocítico en la médula ósea (revisado por Taniguchi, 1988). En modelos murinos de enfermedad de Chagas se ha observado la disminución de la producción de interleuquina-2 (IL-2) (Harel-Bellan y col., 1983) y, en humanos y ratones, modulación negativa de la expresión de su receptor (IL-2R) en los linfocitos T (Beltz y col., 1988; Kierszenbaum y col., 1990; Szein y col., 1990). Esto es debido a una reducción en la transcripción del ARNm tanto de la citoquina como de su receptor (Soong y Tarleton, 1992). Recientemente, Kierszenbaum y col. (1996) han comunicado que tripomastigotes viables inducen reducción de la expresión de IL-2, -4, -5 e IFN- γ citoplásmica por linfocitos T humanos de sangre periférica, activados con fitohemoaglutinina.

III.B.2.c. Linfocitos B, plasmocitos y producción de inmunoglobulinas: En las zonas B de los ganglios linfáticos y del bazo se produce la activación de linfocitos B que poseen receptores de tipo inmunoglobulina (Ig) y que una vez activados pueden actuar como células presentadoras de antígeno (CPA) a los linfocitos T cooperadores (Krieger y col., 1985). Además, el contacto con co-receptores del linfocito T inicia la diferenciación de los linfocitos B a células plasmáticas capaces secretar inmunoglobulinas (Lederman y col., 1992).

La etapa aguda de la infección humana por T.cruzi está caracterizada por la secreción de IgM durante un período de por lo menos tres meses (Israelski y col., 1988; Scott y Goss-Sampson, 1984). La producción de IgG, cuyo pico coincide con el de producción de IgM (Israelski y col., 1988), muestra un patrón de isotipos con predominio de IgG1 e IgG3, teniendo el primero capacidad de activar la lisis complemento-dependiente de tripomastigotes circulantes (Scott y Goss-Sampson, 1984; Romeiro y col., 1984). Resultados obtenidos con ratones confirman estos hallazgos, ya que los isotipos predominantes en la infección murina son IgG2a e IgG2b, con funciones efectoras comparables a la IgG1 humana (fijación complemento, CCDA y opsonización) (Scott y Goss-Sampson, 1984). Los anticuerpos también están involucrados en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA) (Abrahamson y Dias da Silva, 1977).

Independientemente de la producción de una respuesta humoral específica frente al T.cruzi, se ha observado que durante la infección murina se desarrolla una respuesta policlonal B (D'imperio Lima y col., 1985). En este modelo se ha demostrado la expansión preferencial de linfocitos B que presentan el marcador de membrana Ly1 (CD5) (Minoprio y col., 1989). La activación policlonal es dependiente de la cooperación T, ya que el tratamiento con anticuerpos anti-L3T4 (anti-CD4) de ratones infectados, inhibe dicha respuesta (Minoprio y col., 1987). La activación de la expansión preferencial de los linfocitos B CD5+ se relaciona con la producción de autoanticuerpos que estaría bajo control tímico (Smith y col., 1983). Su relevancia en la

enfermedad de Chagas experimental y humana será discutida en la Sección IV (Patología, clínica y patogenia de la enfermedad de Chagas).

III.B.2.d. Linfocitos T: Los linfocitos T comprenden dos fenotipos mayoritarios, CD4+ y CD8+. Su diferencia esencial está relacionada con el contexto de presentación y el tipo de Ag que reconocen. Generalmente se acepta que los linfocitos CD4+ reconocen antígenos procesados por la vía exógena en el contexto de moléculas de clase II, y los linfocitos CD8+ reconocen antígenos procesados por la vía endógena en el contexto de moléculas de clase I (revisado por Germain, 1993). Sin embargo, se han descrito linfocitos CD4 con actividad citotóxica que reconocen antígenos en el contexto de moléculas de clase I (Strassman y Bach, 1984) y linfocitos CD8 que lo hacen en el contexto de clase II (Salgame y col., 1991).

Estudios funcionales *in vivo* sobre el papel de las subpoblaciones de linfocitos T en la enfermedad de Chagas, demostraron que ambos fenotipos están involucrados en la protección contra la diseminación parasitaria durante la fase aguda. En la década del '70 estudios realizados en ratones (Schmunis y col., 1971) y ratas (Roberson y col., 1973) neonatalmente timectomizados y en ratones tratados con suero anti-timocito (Roberson y col., 1973), demostraron disminución de la sobrevida de los mismos cuando eran infectados con T.cruzi. En estudios experimentales posteriores se demostró, empleando ratones atímicos «nude» (nu/nu, genéticamente deficientes en linfocitos T), que estos linfocitos eran necesarios para controlar la parasitemia (Kierszenbaum y Pienkowski, 1979). Russo y col. (1988), identificaron como CD4+ el fenotipo de los linfocitos T responsables del control de la parasitemia. Al eliminar dicha población de linfocitos *in vivo*, mediante el uso de Ac monoclonales, observaron aumento de la parasitemia y de la mortalidad. Estudios posteriores de Tarleton (1990) demostraron que también los linfocitos T CD8 tienen un papel preponderante en el control de la infección. Ratones tratados con Ac monoclonales (AcMo) anti-CD8 para eliminar la población supresora/citotóxica presentaban parasitemias de mayor magnitud que los controles. En el mismo estudio, el tratamiento con dicho AcMo, impedía el desarrollo de inmunidad conferida por inmunización con epimastigotes en ratones no tratados y revertía la inmunidad en ratones preinmunizados y tratados. En estos casos, los ratones tratados con el AcMo mostraban parasitemias mayores y tiempos menores de sobrevida. Empleando ratones «knock-out» para el gen de la β_2 -microglobulina (y que por lo tanto no expresan moléculas de clase I del CMH), el mismo grupo observó que los ratones, deficientes en linfocitos T CD8, presentan mayores parasitemias, menores tiempos de sobrevida y mayor parasitismo tisular durante la fase aguda (Tarleton y col., 1992). En el modelo murino se demostró que durante la etapa aguda de la infección predominan los linfocitos CD8+ (Sun y Tarleton, 1993). En otros estudios, se demostró que en los ratones crónicamente infectados existen linfocitos T CD8 con actividad citotóxica específica contra el parásito, restringida por el CMH (Nickell y col., 1993), lo cual explica el

menor parasitismo sanguíneo y tisular en los ratones normales de los experimentos de Tarleton y sus colaboradores.

Estos estudios demostraron, por lo tanto, que las poblaciones de linfocitos T CD4 como CD8 son necesarias para controlar la diseminación parasitaria durante la etapa aguda de la infección.

IV. PATOLOGIA, CLINICA Y PATOGENIA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

La infección por *T. cruzi* origina un conjunto de alteraciones patológicas de localización bien definida. Dicha patología está vinculada de diversas maneras con las características biológicas del parásito y con alteraciones en los mecanismos de regulación del sistema inmune durante la infección. Si bien hasta el momento está en discusión la secuencia causal de los fenómenos que dan lugar a la patología (Ribeiro dos Santos y Hudson, 1980; Minoprio y col., 1991), y el origen autoinmune de la fase crónica no ha sido fehacientemente comprobado (Kierszenbaum, 1986), algunos de los aspectos de la patogenia y el desarrollo de la patología han sido aclarados recientemente.

IV.A. PATOLOGIA

Como consecuencia de la invasión parasitaria de diversos tejidos (cardíaco, muscular esquelético, nervioso, etc.) durante la fase aguda y de la respuesta inflamatoria local desencadenada en los mismos, se desarrollan alteraciones histológicas progresivas que se manifestarán en la clínica y anátomo-patología como trastornos cardiovasculares, del sistema nervioso autónomo y/o del periférico durante la fase crónica de la enfermedad.

IV.A.1. *CORAZON Y SISTEMA CARDIOVASCULAR*

Durante el período agudo de la infección humana o experimental se desarrollan focos inflamatorios necróticos en el miocardio (revisado por Andrade y Andrade, 1979). Dichos infiltrados se hallan invariablemente asociados a la presencia de parásitos (Molina y Kierszenbaum, 1988; Palacios-Prü y col., 1989) o de antígeno parasitario. Teixeira y Dvorak (1985) han demostrado que durante la fase aguda, el parasitismo es más acentuado en las fibras musculares de tipo I, las únicas presentes en el corazón (Lawrie, 1952).

En la infección crónica humana, histológicamente se observa fibrosis miocárdica progresiva, acompañada por un infiltrado mononuclear (Rosenbaum, 1964; Molina y Kierszenbaum, 1988). En modelos experimentales se ha establecido que la destrucción ganglionar (denervación) de los plexos nerviosos autónomos que inervan el corazón, es un fenómeno que tiene lugar desde las primeras etapas de la infección como consecuencia del fenómeno inflamatorio, que además compromete los nódulos sinusal y auricular, así como el haz de His y sus ramas durante la fase crónica (Molina y col., 1988). La naturaleza focal de las lesiones sugiere que parte del compromiso cardíaco durante la fase crónica se debería a alteraciones de la microvasculatura (Factor y col., 1985). Como resultado de las modificaciones estructurales mencionadas, que conducirían a la hipoxia (Rossi y Carobrez, 1985), se originaría la necrosis y fibrosis miocárdica y se manifestarían las alteraciones fisiológicas características del corazón chagásico crónico.

IV.A.2. *SISTEMA NERVIOSO AUTONOMO*

En la enfermedad de Chagas humana y experimental se observa la despoblación neuronal de los ganglios del sistema nervioso autónomo (SNA) desde la fase aguda, tanto en el corazón (revisado por Oliveira, 1985) como en el tubo digestivo (revisado por Rezende y Luquetti, 1994). Estudios experimentales comparando diversas poblaciones de *T. cruzi* han demostrado que no existe correlación entre la población parasitaria y la severidad del daño autonómico (de Souza y col., 1996). Como consecuencia de la destrucción de los plexos intramurales (Alcántara, 1970) de estas visceras se produce la dilatación de las mismas, que tendrá consecuencias clínicas que serán analizadas en otro apartado.

IV.A.3. *SISTEMA NERVIOSO PERIFERICO*

Si bien constituyen una alteración de menor significación clínica que las precedentes, las lesiones de sistema nervioso periférico son un rasgo frecuente de la infección chagásica (revisado por Sica, 1994). Los estudios electrofisiológicos (Sanz y col., 1977; Sanz y col., 1978; Sica y col., 1979) y de anatomía patológica (Taratuto y col., 1978; Sica y col., 1979) demuestran la existencia de denervación de fibras motoras en la enfermedad humana. En el modelo murino, la necrosis de las miofibras, la centralización nuclear y la presencia de infiltrados inflamatorios, son las características histológicas más evidentes en relación al daño miopático (González Cappa y col., 1987; Losavio y col., 1989). También se observan fenómenos neuropáticos en músculo, puestos en evidencia por la presencia de fibras atroficas,

agrupamiento histoquímico de fibras tipo II y atrofia aislada o agrupada de miofibras (González Cappa y col., 1987; Molina y col., 1987; Losavio y col., 1989). Como se mencionó anteriormente, estudios experimentales en un modelo murino de infección aguda ha demostrado que las fibras tipo I (contracción lenta) presentan un mayor parasitismo que las tipo II (Teixeira y Dvorak, 1985). En los nervios periféricos en modelos experimentales, se observan signos de desmielinización, degeneración axonal y remielinización (González Cappa y col., 1987; Molina y col., 1987; Losavio y col., 1989). Las alteraciones histológicas mencionadas se pueden correlacionar con los aspectos clínicos en modelos experimentales y en humanos (revisado por Sica y col., 1995), que se discuten brevemente en la siguiente sección.

IV.B. CLINICA

Una de las características de la enfermedad de Chagas es el desarrollo de una fase aguda, raramente letal, que en el humano se manifiesta ocasionalmente con síntomas y signos clínicos no patognomónicos (fiebre, eventualmente miocarditis aguda), a excepción del signo de Romana (edema bpalpebral unilateral, adenopatía satélite, etc.) y la parasitemia relativamente elevada. En general, el curso agudo no reviste diferencias marcadas con otras patologías en las cuales se desarrolla un síndrome infeccioso, caracterizado por un cuadro febril, acompañado de adenopatías, hepatomegalia y esplenomegalia leves o moderadas (revisado por Lugones y col., 1994). Excepcionalmente en algunos individuos se desarrolla un curso agudo grave, asociado a miocarditis o meningoencefalitis (revisado por Andrade y Andrade, 1993). A la fase aguda continúa un prolongado período de silencio clínico y parasitemia indetectable por los métodos de rutina, conocido como fase indeterminada. En la fase crónica, diez o más años después del inicio de la infección, es cuando se manifiestan los cuadros clínicos más severos asociados con esta enfermedad, relacionados con las disfunciones del aparato digestivo, incluyendo disfagias y alteraciones del tránsito intestinal (revisado por Rezende y Luquetti, 1994), y del corazón (alteraciones de la contractilidad del miocardio y de la conducción, cardiomegalia): arritmias, disfunción autonómica e insuficiencia cardíaca (revisado por Storino, 1994).

IV.C. PATOGENIA

Se han propuesto varias hipótesis para el desarrollo de la patogenia chagásica crónica. Ribeiro dos Santos y Hudson (1980) argumentan que la invasión tisular desencadenaría un fenómeno inflamatorio que comprometería tanto las células infectadas, como las no infectadas adyacentes. En este caso, la progresión de la respuesta inflamatoria y la respuesta frente a antígenos autólogos sería consecuencia directa de la lisis celular mediada por el parásito y de la

presencia de sus antígenos, asociados a los tejidos infectados. La segunda hipótesis propuesta por Minoprio y col. (1991), señala que la infección parasitaria originaría un desbalance entre poblaciones de linfocitos reguladores de la respuesta inmune, desencadenando una respuesta policlonal y el desarrollo de autoinmunidad, por la supresión de la autotolerancia. Por último, diversos autores han determinado la existencia de epitopes comunes al parásito y al huésped (Van Voorhis y Eisen, 1989; Mesri y col., 1990) que podrían ser responsables de la abrogación de la tolerancia inmunológica frente a Ags propios (Félix y col., 1993).

IV.C.1. MECANISMOS PATOGENICOS DEPENDIENTES DEL PARASITO

El principal mecanismo patogénico mediado en forma directa por el parásito es la lisis celular de los tejidos afectados. La penetración del parásito en las células blanco requiere el reconocimiento de ligandos o receptores en las mismas (Kierszenbaum y Stiles, 1985).

Luego de la multiplicación parasitaria y de la lisis de la célula huésped tiene lugar la liberación de antígenos tanto parasitarios como propios al torrente circulatorio. Estos promueven la formación local de infiltrados inflamatorios asociados, al menos en principio, a la presencia de parásitos o sus antígenos. En este sentido, se ha descrito la asociación *in vitro* de antígeno parasitario a la membrana plasmática de células de mamífero no infectadas e infectadas así como la destrucción de ambas por poblaciones linfoides (Ribeiro dos Santos y Hudson, 1980; Araujo, 1985).

Si bien no se han descripto toxinas específicas liberadas por *T. cruzi*, se ha observado que ácidos grasos insaturados de la membrana celular de tripomastigotes pueden ejercer efecto citotóxico sobre células de neuroblastoma en cultivo (Asahi y col., 1986). Es probable que la destrucción de parásitos en los tejidos, mediada por mecanismos inmunológicos, tenga efectos secundarios sobre las células no infectadas de los tejidos invadidos como consecuencia de la liberación de lípidos de la membrana parasitaria. Por otra parte, Kierszenbaum y col. (1990) han descrito la existencia de una(s) sustancia(s) de naturaleza proteica(s) de *T. cruzi* (PM entre 30 y 100 kDa) que inhibe(n) la expresión del receptor de IL-2. El probable papel de factores como los mencionados en la patogenia de la enfermedad será descrito en el siguiente apartado.

Tanowitz y col. (1990) observaron en un modelo murino de infección aguda por *T. cruzi* y estudiando *in vitro* células endoteliales humanas, que las células parasitadas inducían un aumento de la agregación plaquetaria. Esto sugeriría que las alteraciones microvasculares que acontecen durante la fase aguda, como consecuencia del parasitismo endotelial, podrían ser el sustrato para las alteraciones observadas durante la fase crónica de la infección, incluyendo el tromboembolismo (Oliveira y col., 1983). Los cambios mencionados podrían estar vinculados con modificaciones en la expresión de moléculas de adhesión, resultantes de la infección de

las células endoteliales. En este sentido, D'Avila Reis y col. (1993a) observaron que las células endoteliales de pacientes con cardiomiopatía chagásica crónica expresan E-selectina, a diferencia de los individuos normales o los que se hallan en fase indeterminada, aunque en ese trabajo no se hace referencia a moléculas de adhesión plaquetaria (por ejemplo, CD36).

IV.C.2. MECANISMOS PATOGENICOS DEPENDIENTES DE LA RESPUESTA INMUNE

La presencia de infiltrados celulares mononucleares de importante magnitud, asociada a la escasa o nula presencia de parásitos y antígeno parasitario en la fase crónica de la enfermedad, indujo a muchos grupos de investigación a evaluar si la respuesta inmune desencadenada por el parásito era, al menos en parte, responsable de la patología observada. En especial, Köberle (revisado por Köberle, 1974) plantea como hipótesis que diversos antígenos parasitarios (toxinas) o antígenos liberados luego de la destrucción parasitaria mediada por la respuesta inmune, originan *in situ* una respuesta inflamatoria que producen la denervación del sistema nervioso autónomo, dando lugar a las megavisceras (megacolon, megaesófago y cardiomegalia).

Numerosas líneas de investigación desarrolladas tuvieron como objetivo determinar de qué manera la inmunidad humoral o celular estaban involucradas en la patogenia de la enfermedad de Chagas crónica. Las evidencias experimentales más fuertes a favor de un papel de la respuesta inmune humoral en la patogenia provienen de trabajos sobre reactividad de sueros y fracciones γ -globulínicas humanas de pacientes chagásicos que reconocen estructuras tisulares (Cossio y col., 1974; Szarfman y col., 1977) o de anticuerpos monoclonales murinos y de rata que definen epitopes comunes entre el parásito y tejidos del huésped (Wood y col., 1982; Snary y col., 1983; Towbin y col., 1987; Paulin y col., 1988). Estos estudios demostraron la existencia de reactividad serológica frente a antígenos propios que en muchos casos correspondían a antígenos altamente conservados en la escala evolutiva (Paulin y col., 1988; Levitus, 1991). Si bien los estudios experimentales *in vivo*, la obtención de anticuerpos monoclonales y los estudios de expresión de secuencias génicas han permitido demostrar la presencia de anticuerpos autorreactivos y de epitopes comunes (Van Voorhis y Eisen, 1989; Van Voorhis WC y col., 1991; Levin y col., 1989; Mesri y col., 1990), hasta el presente ninguna investigación ha permitido probar que, *in vivo*, los anticuerpos estén relacionados con mecanismos efectores del daño.

Una explicación plausible de la amplia autorreactividad observada en la respuesta humoral, comprobada en modelos murinos, es la existencia de activación policlonal que afecta a los linfocitos B (D'Imperio Lima y col., 1985; Minoprio y col., 1986a; Minoprio y col., 1989) y que se extiende hasta la fase crónica (D'Imperio Lima y col., 1986). Además se observó que la

respuesta policlonal abarca a los linfocitos T (Minoprio y col., 1986a; Minoprio y col., 1986b). Por otra parte, linfocitos T CD4 serían los responsables de la activación policlonal B y T que se manifiesta durante la infección (Minoprio y col., 1987). La activación policlonal B se manifiesta por la expansión de clones B que secretan IgG1, IgG2a e IgG2b (D'Imperio Lima y col., 1985). Es importante recordar que estos isotipos no son predominantes en la infección humana, si bien la IgG2 puede permanecer elevada por períodos prolongados (Israelski y col., 1988).

Según Minoprio (1991), en el modelo murino la desregulación del sistema inmunológico, una de cuyas expresiones es la activación policlonal, estaría asociada a una respuesta de tipo Th2. Esta expansión incluye linfocitos B CD5+ y T CD4⁺ CD8⁻ (Minoprio y col., 1989), que han sido involucrados en patologías autoinmunes mediadas por Ac (revisado por Smith y Steinberg, 1983). Esta población de linfocitos B secreta IL-10 (O'Garra y col., 1992), citoquina que inhibe la activación de linfocitos Th1 (Fiorentino y col., 1991) los que secretan citoquinas activadoras de la inmunidad celular (Mossman y col., 1986).

Otros aspectos de la desregulación de la respuesta inmune durante la infección por T.cruzi están relacionados con las alteraciones en la producción de citoquinas. En los seres humanos (Teixeira y col., 1978; Cetron y col., 1993) y en diversos modelos murinos de enfermedad de Chagas (Cunningham y col., 1978; Liew y col., 1987) se ha detectado inmunosupresión, tanto específica como a antígenos no parasitarios, durante la fase aguda (revisado por Szein y Kierszenbaum, 1993). Estudios experimentales en este último modelo han demostrado que parte de este fenómeno está relacionado con la disminución de los niveles de IL-2 (Harel-Bellan y col., 1985; Tarleton, 1988a, 1988b), o de la expresión de su receptor (IL-2R) (Beltz y col., 1988; Kierszenbaum y col., 1989; Szein y col., 1990). Estos resultados son coincidentes con la inmunodepresión aunque no serían la única explicación del fenómeno, ni de las diferencias en susceptibilidad de las distintas líneas de ratones. Como se mencionó previamente, diversos autores han sugerido que en las distintas asociaciones línea de ratón/cepa de parásito, el desarrollo de la infección está vinculado con la constitución genética del huésped (Trischmann y col., 1978; Wrightsman y col., 1982; Trischmann y Bloom, 1982). Estudios recientes, sobre producción de citoquinas por distintas líneas de ratones, durante la infección por T.cruzi, muestran resultados discordantes al respecto. En efecto, por una parte Eski y col. (1996) realizaron ensayos sobre la producción *in vitro* de citoquinas por células linfoides de ratones infectados que mostraron correlación positiva entre el haplotipo resistente (H-2^d) y la producción de IL-2 e IFN- γ , citoquinas producidas durante una respuesta Th1; el mismo tipo de correlación se observó entre la producción de IL-4 (citoquina producida durante una respuesta Th2) y el haplotipo susceptible (H-2^k), en tanto la producción de IL-10 correlacionaba inversamente con la producción de IFN- γ . Además, el mismo estudio mostró que la cinética de producción de las citoquinas dependía del compartimento linfoide considerado (bazo o ganglios linfáticos).

Por el contrario, un estudio de caracterización *in situ* de la cinética de producción de citoquinas de tipo Th1 (IL-2 e IFN- γ), Th2 (IL-4, IL-5 e IL-10), proinflamatorias (TNF- α , IL-1 α e IL-6) y reguladoras (TGF- β), y del fenotipo celular involucrado en la misma, empleando modelos murinos resistentes y susceptibles, demostró que no existían diferencias en la producción de citoquinas de ambos tipos a excepción del tiempo de aparición de dichas células en el bazo; en los ratones susceptibles, las citoquinas Th1 aparecían sólo un poco más tarde que en los resistentes, pero manifestaban la aparición más precoz de TNF- α (Zhang y Tarleton, 1996). Esta citoquina proinflamatoria ha sido involucrada en la caquexia que manifiestan los ratones susceptibles a la infección antes de su muerte (Starobinas y col., 1991).

En general existe acuerdo entre los investigadores en cuanto al papel que los linfocitos T CD4 tienen en el desarrollo de la patología en los modelos experimentales de la enfermedad de Chagas. En los estudios *in vivo*, empleando modelos murinos, se ha demostrado que estas células originan lesiones mediante mecanismos de hipersensibilidad retardada en tejido nervioso (Said y col., 1985; Hontebeyrie-Joskowicz y col., 1987) y cardíaco (Ribeiro dos Santos y col., 1992). El tratamiento con anticuerpos monoclonales frente a esta población celular disminuye la intensidad de la respuesta inflamatoria cardíaca (Russo y col., 1988).

Por el contrario, el papel de los linfocitos T CD8 en la patogenia aún no está totalmente esclarecido. Recientemente se ha comunicado que estas células predominan en las lesiones inflamatorias cardíacas en la infección aguda humana y experimental (Sun y Tarleton, 1993). Como se mencionó en la Sección III.B.2.d, el concepto actual es que estas células están involucradas en la destrucción de células parasitadas limitando la diseminación de los parásitos en los tejidos. De hecho, en estudios realizados por Tarleton y col. (1992), los autores observaron que la disminución de la carga parasitaria en los tejidos estudiados (músculo esquelético y cardíaco) precede a la disminución de la frecuencia de linfocitos T CD8 en el infiltrado.

OBJETIVOS

GENERALES

Analizar los mecanismos de daño tisular, en un modelo murino de neuropatía periférica asociada a la enfermedad de Chagas y su dependencia con respecto a la población parasitaria.

ESPECIFICOS

1. Analizar el curso de las alteraciones electrofisiológicas e histopatológicas del sistema nervioso periférico (SNP), producidas en ratones infectados por poblaciones de *T.cruzi* con características biológicas marcadamente diferentes: CA-I (y el clon K-98), miotrópica y habitualmente no letal para el ratón, y RA, reticulotrópica/pantrópica y habitualmente letal.
A los fines de este trabajo de investigación se convino en considerar SNP a la unidad formada por músculo isquiotibial, nervio ciático y médula espinal dorsolumbar.
2. Establecer el fenotipo de las poblaciones celulares en las lesiones inflamatorias del SNP producidas durante la infección.
3. Determinar la presencia de componentes de la respuesta inmune humoral y de antígeno parasitario en las lesiones.
4. Evaluar la respuesta proliferativa de subpoblaciones de linfocitos T de ratones infectados con *T.cruzi*, frente a los tejidos nervioso y muscular.
5. Evaluar la capacidad de las subpoblaciones de linfocitos T para producir patología neuromuscular.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Se realizaron estudios en ratones endocriados C3H/HeN, con el fin de establecer si existían diferencias en las características de las lesiones provocadas por dos cepas de *T. cruzi* que difieren en virulencia, tropismo e inmunogenicidad.

Establecidas las características electrofisiológicas e histológicas de la progresión de las lesiones en ratones endocriados infectados con las dos cepas, se analizó el fenotipo de los infiltrados inflamatorios, mediante la caracterización de las poblaciones celulares inmunocompetentes y de los componentes humorales presentes en los tejidos afectados durante las fases aguda y crónica de la infección.

Con el objeto de establecer si los hallazgos in vivo se debían, al menos en parte, a mecanismos específicos de autorreactividad, se determinó la respuesta proliferativa de las subpoblaciones de linfocitos T de ratones infectados, frente a antígenos de SNP.

Establecida la existencia de la misma se determinó la responsabilidad de las subpoblaciones de linfocitos T cooperadores/inductores y citotóxicos de ratones infectados, en la inducción de lesiones en SNP.

MATERIALES Y METODOS

I. GENERALES

Los materiales y la metodología descritos en esta sección se emplearon en todos los estudios realizados, salvo que se indique lo contrario específicamente.

I.A. ANIMALES

Para los estudios que se describen en esta Tesis se emplearon ratones C3H/HeN endocriados, machos de 21-25 días o 4-6 semanas de edad dependiendo del experimento, que se mantuvieron en grupos de 4 a 6 animales por jaula proveyéndoles agua y alimento balanceado *ad libitum*, salvo indicación. Para el mantenimiento de las cepas de T.cruzi en nuestro laboratorio se usan ratones Rockland exocriados, machos de 21 a 25 días de edad.

I.B. MANTENIMIENTO DE LAS CEPAS DE T.CRUZI:

La cepa CA-I, aislada de un paciente con miocardiopatía chagásica crónica (González Cappa y col., 1980), se mantiene habitualmente por pasaje cada 30-45 días, mediante inoculación por vía intraperitoneal (ip) de 2×10^5 tripomastigotes sanguíneos (TS). El clon K-98, obtenido de la anterior y con las mismas características biológicas que la cepa (Celentano y González Cappa, 1992) se mantiene en iguales condiciones. La cepa RA, aislada de un caso agudo de enfermedad de Chagas (González Cappa y col., 1981), es mantenida por pasaje semanal, mediante inoculación de 2×10^5 por vía ip.

Como rutina en nuestro laboratorio para los pasajes se sacrifican los ratones mediante anestesia con éter etílico y se obtiene sangre por punción cardíaca en condiciones de esterilidad. La sangre se diluye en solución salina tamponada con fosfatos pH 7,2 (PBS) conteniendo 1 o 5% de suero homólogo inactivado para proteger los parásitos ante altas diluciones de la sangre (Müller y González Cappa, 1985), para su inoculación en ratones para pasaje o experimentación.

I.C. INFECCION DE LOS RATONES EXPERIMENTALES

Para los estudios realizados durante el curso de la infección se inocularon por vía ip 5×10^4 TS de la cepa CA-I y 50-100 TS de la cepa RA. La utilización de estas dosis se basó en estudios previos sobre desarrollo de la respuesta inmune a la infección. Las dosis empleadas fueron aquellas capaces de desencadenar la mayor respuesta inmune humoral, medida como anticuerpos líticos (Müller y col., 1986) y neutralizantes (Sánchez y González Cappa, 1983; Müller y González Cappa,

1987). Para los estudios de proliferación linfocitaria y de transferencia pasiva de patología mediada por linfocitos T se emplearon los inóculos señalados más arriba.

I.D. DETECCION Y CUANTIFICACION DE LA PARASITEMIA

En el caso de la cepa CA-I y el clon K-98 se determinó la presencia de parásitos en sangre periférica mediante microhematocrito (MHT; Freilij y col., 1983) o por recuento con hemocitómetro a los 15, 120 y 270 días post-infección (pi). En el caso de la cepa RA se realizaron los mismos estudios a los 4, 7, 15, 120 y 270 días pi.

I.E. TRATAMIENTO FARMACOLOGICO

Con el fin de obtener ratones crónicamente infectados con la cepa RA, altamente letal, se trataron ratones infectados y controles con dos dosis de benznidazol de 1 mg/g peso corporal, a los 4 y 10 días pi. Con este esquema los ratones no curan pero disminuye la parasitemia, lográndose la sobrevida del 95-100% de los animales. Como controles farmacológicos se emplearon ratones no infectados tratados con el mismo esquema terapéutico.

II. ESTUDIOS ELECTROMIOGRAFICOS (EMG)

Con el fin de establecer si existía algún tipo de correlación entre las alteraciones fisiológicas e histológicas que se desarrollan a nivel neuromuscular durante la infección se realizaron estudios electrofisiológicos *in vivo*.

Para ello se estudiaron los siguientes grupos experimentales:

- 1) Ratones infectados con ambas poblaciones parasitarias.
- 2) Ratones no infectados (controles).

Los EMG se efectuaron con un electromiógrafo Akonic 408 provisto de un electrodo de registro tipo aguja coaxial Akonic 60ACO2 que se insertó en el músculo isquiotibial izquierdo, con el fin de analizar las características de los potenciales de unidad motora (PUM). Los datos fueron almacenados en un osciloscopio ATI 801. Los PUM se alimentaron a través de un amplificador con una relación señal a ruido elevada.

Se registraron la amplitud, duración y número de fases de los PUM, que aportan datos sobre el tamaño de la unidad motora (signos de remodelación), y la actividad espontánea en reposo (fibrilación y ondas positivas), que es evidencia de denervación. El patrón interferencial de la actividad voluntaria fue registrado luego de estimular el músculo apretando suavemente el extremo distal de la pata. Un patrón de interferencia completo indica integridad en la unidad motora (González Cappa y col., 1987).

III. ESTUDIOS HISTOLOGICOS E INMUNOHISTOQUIMICOS

III.A. OBTENCION Y PRESERVACION DE LAS MUESTRAS DE TEJIDO

Muestras de músculo isquiotibial, nervio ciático y médula espinal se obtuvieron a partir de los grupos señalados en la sección anterior, a distintos tiempos post-infección (pi) o post-transferencia (pt). Estos tiempos fueron seleccionados a partir de un estudio longitudinal de infección con la cepa CA-I (Losavio y col., 1989). En el caso de músculo, para evitar la vacuolización celular, el tejido fue rápidamente transferido a una cápsula de Petri conteniendo talco y, en forma inmediata luego de eliminar el excedente de polvo, se procedió a congelar el material. Las muestras se congelaron directamente en N₂ líquido (músculo) o en isopentano preenfriado en N₂ líquido (nervio ciático y médula espinal). El material congelado se almacenó en nitrógeno líquido hasta su preparación para los estudios histológicos e inmunohistoquímicos.

III.B. ESTUDIOS HISTOLOGICOS

Las muestras congeladas se cortaron con criostato (IEC, Damon, USA) en secciones de 4-6 µm y fueron fijadas en formol 10% o Bouin. Las secciones fueron teñidas con hematoxilina de Mayer-eosina (H&E).

Los infiltrados se cuantificaron empleando un analizador de imágenes Zidas (Zeiss) y se clasificaron de acuerdo a la siguiente escala: a) leves, infiltrados focales ocupando una superficie de los campos del preparado menor que el 25%; b) moderados, infiltrados nodulares no coalescentes, comprometiendo 25 - 50% de la superficie y c) intensos, infiltrados nodulares coalescentes comprometiendo más del 50% de la superficie.

III.C. ESTUDIOS INMUNOHISTOQUIMICOS (IHQ)

Se cortaron secciones de 4-6 µm con criostato que se fijaron por inmersión en acetona a 4°C durante 10 min. Los cortes se preservaron a -20°C (por un tiempo no mayor de una semana) o a -70°C (hasta dos meses) hasta la realización de las pruebas IHQ. Para éstas las secciones se descongelaron, se secaron al aire y se rehidrataron en PBS (0,137 M ClNa; 2,7 mM ClK; 8 mM PO₄HNa₂, 15 mM PO₄H₂Na) o en Tris salino (0,15 M ClNa en 0,05 M Tris, pH 7,4; TBS) durante 5 min. A partir de ese momento se evitó que las secciones se secaran, manteniéndolas en cámara húmeda.

Con el fin de analizar la composición celular de los infiltrados inflamatorios, detectar depósitos de proteínas séricas (inmunoglobulinas y/o complemento) y establecer la presencia de parásitos o Ag parasitario, se emplearon las técnicas de inmunofluorescencia directa (IFD) ó indirecta (IFI)

(Johnson y col., 1978) ó de avidina marcada con peroxidasa (LAB, por «labelled avidin/biotin») (Guesdon y col., 1979; Kurstak, 1986).

III.C.1. ANTICUERPOS Y CONJUGADOS EMPLEADOS EN IHQ

III.C.1.a. Inmunofluorescencia: Para la realización de esta técnica se usaron los siguientes anticuerpos:

i. *Anticuerpos Primarios*

1. IgG policlonal de cabra anti-IgM Fc de ratón, purificada por afinidad, marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC-anti-IgM) (Cappel Labs., Inc., Cochranville, PA ó Sigma Chemical Co., St. Louis, MO).
2. IgG policlonal de cabra anti-IgG Fc de ratón, purificada por afinidad, marcada con FITC (FITC-anti-IgG) (Cappel ó Sigma).
3. IgG policlonal de cabra anti-C3 de ratón, purificada por afinidad, marcada con FITC (FITC-anti-C3) (Cappel).
4. IgG2b monoclonal de rata anti-CD11b (receptor para C3b en macrófagos y leucocitos polimorfonucleares, PMN) de ratón purificada por afinidad (anti-CD11b) (Sera-Lab, Ltd., Crawley Down, Sussex).
5. IgG2b monoclonal de rata anti-Thy1.2 (receptor pan-T) de ratón purificada por afinidad (anti-Thy) (Becton-Dickinson, Mountain View, CA).
6. IgG2a monoclonal de rata anti-CD8 (linfocitos T citotóxicos, TC) de ratón purificada por afinidad (anti-CD8) (Becton-Dickinson).
7. IgG2b monoclonal de rata anti-CD4 (linfocitos T cooperadores, TH) de ratón purificada por afinidad (anti-CD4) (Becton-Dickinson).
8. IgG de policlonal de conejo anti-*T.cruzi* (anti-Tc) obtenida en nuestro laboratorio, por infección de conejos, y purificada por mediante cromatografía de intercambio iónico (Baumstark y col, 1964). Este Ac detecta todos los estadios parasitarios de las cepas empleadas en esta Tesis.

ii. *Anticuerpos Secundarios*

1. IgG policlonal de cabra anti-IgG Fc de rata, purificada por afinidad, marcada con FITC (FITC-anti-rata) (Sigma ó Zymed Labs., Inc., San Francisco, CA).
2. IgG policlonal de cabra anti-IgG Fc de conejo, purificada por afinidad, marcada con FITC (FITC-anti-conejo) (Sigma).

III.C.1.b. Biotina/Avidina-Peroxidasa (BAP): Cuando se utilizó esta técnica se emplearon los siguientes reactivos:

i. *Anticuerpos Primarios*

1. IgG policlonal de cabra anti-IgM Fc de ratón (anti-IgM) purificada por afinidad (Sigma).
2. IgG policlonal de cabra anti-IgG Fc de ratón (anti-IgG) purificada por afinidad (Sigma)
3. IgG policlonal de conejo anti-asialo-GM1 (células NK) (Wako Chemicals Inc., Dallas, Texas).
4. IgG2b monoclonal de rata anti-CD11b (receptor para C3b en macrófagos y leucocitos polimorfonucleares, PMN) de ratón purificada por afinidad (anti-CD11b) (Sera-Lab, Ltd., Crawley Down, Sussex).
5. IgG2b monoclonal de rata anti-Thy1.2 (receptor pan-T) de ratón purificada por afinidad (anti-Thy) (Becton-Dickinson).
6. IgG2a monoclonal de rata anti-CD8 (linfocitos T citotóxicos, Tc) de ratón purificada por afinidad (anti-CD8) (Becton-Dickinson).
7. IgG2b monoclonal de rata anti-CD4 (linfocitos T cooperadores, Th) de ratón purificada por afinidad (anti-CD4) (Becton-Dickinson).
8. IgG de policlonal de conejo anti-*T. cruzi* (anti-Tc) obtenida en nuestro laboratorio, por infección de conejos con la cepa RA, y purificada por mediante cromatografía de intercambio aniónico (Baumstark y col, 1964).

ii. *Anticuerpos Secundarios*

1. IgG de cabra anti-IgG Fc de rata, purificada por afinidad, marcada con biotina (biotinil-anti-rata) (Sigma).
2. IgG de conejo anti-IgG Fc de cabra, purificada por afinidad, marcada con biotina (biotinil-anti-cabra) (Sigma).
3. IgG de cabra anti-IgG Fc de conejo, purificada por afinidad, marcada con biotina (biotinil-anti-conejo) (Sigma).

iii. *Conjugado Enzimático*

Se empleó Avidina/Streptavidina-Peroxidasa (Extravidina, Sigma).

III.C.1.c. Titulación de los Ac y del conjugado enzimático: La dilución óptima de los anticuerpos, para marcadores de poblaciones de células mononucleares, se estableció empleando cortes de bazo y ganglio linfático de ratón normal, realizados en criostato. Las diluciones empleadas

en la titulación fueron: 1:10, 1:20, 1:40, 1:80 y 1:160 para IF, y 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 y 1:600 para BAP.

La dilución óptima de la IgG anti-Tc se determinó sobre cortes músculo de ratones con infección aguda, conteniendo amastigotes detectados mediante H&E. Las diluciones empleadas en la titulación fueron: 1:10, 1:25, 1:50, 1:100 y 1:200.

En el caso de métodos indirectos (IFI y BAP) se empleó un esquema de panel cruzado para determinar la combinación de diluciones óptimas de Ac primario y secundario. Un esquema similar se empleó para determinar la dilución óptima de conjugado enzimático.

En todos los casos los Ac se diluyeron PBS o TBS conteniendo 5% de suero normal homólogo al conjugado. Las diluciones de conjugado enzimático se diluyeron en TBS o PBS sin suero.

III.C.2. INMUNOMARCACION

Las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente (20-25°C) durante 30 min, salvo indicación. Luego de cada incubación con los Ac específicos se realizaron tres lavados de 5 min en PBS o TBS, para eliminar el Ac excedente.

Los Ac fueron aplicados a las muestras en las secuencias que se detallan continuación:

III.C.2.a. Inmunofluorescencia directa

- i. Suero normal homólogo al conjugado (bloqueo de la marcación inespecífica).
- ii. FITC-anti-IgM ó FITC-anti-IgG, en oscuridad (Detección de linfocitos B o depósitos de inmunoglobulinas).
- iii. Montaje en Tris-glicerol 10%, pH 8,6.

III.C.2.b. Inmunofluorescencia indirecta

- i. Suero normal homólogo al conjugado (bloqueo de la marcación inespecífica).
- ii. Ac primario (desarrollado en rata o conejo): específico para las distintas poblaciones celulares.
- iii. Ac secundario: FITC-anti-rata o FITC-anti-conejo.
- iv. Montaje en Tris-glicerol 10%, pH 8,6.

III.C.2.c. BAP

- i. Fenilhidrazina.HCl 1% en TBS, 60 min a 37°C (bloqueo de peroxidasa endógena). Lavado

(PBS o TBS, 3 cambios de 5 min).

- ii. Suero normal homólogo al conjugado (Bloqueo de la marcación inespecífica).
- iii. Ac primario: específico para las distintas poblaciones celulares. En algunos experimentos fue incubado 16-18 horas a 4°C.
- iv. Ac secundario: Ac biotinilado anti-Ac primario.
- v. Extravidina-Peroxidasa.
- vi. Revelador: 3,3',4,4'-diaminobenzidina.4HCl (DAB) 0,5 mg/ml en TBS conteniendo 0,01% H_2O_2 (sustrato) en oscuridad. El desarrollo de color se controló mediante observación microscópica breve y esporádica hasta marcación óptima. Luego del revelado se detuvo la reacción lavando el sustrato mediante inmersión en agua destilada.
- vii. Deshidratación progresiva en alcoholes y xileno y montaje final con bálsamo de Canadá. En algunos casos se realizó contracoloración con H&E o eosina solamente, antes de la deshidratación y el montaje.

III.C.3. CUANTIFICACION DE LAS POBLACIONES CELULARES

El recuento de las células inflamatorias se realizó mediante dos métodos, dependiendo de la técnica de inmunomarcación empleada. En el caso de marcación mediante inmunofluorescencia se usó un ocular reticulado, determinando la cantidad de células marcadas en los tejidos estudiados, analizando 100 campos. Cuando el método empleado fue biotina avidina-peroxidasa, se emplearon analizadores de imágenes Zidas o Vidas (Carl Zeiss). En este último caso se analizaron treinta campos de cuatro secciones diferentes no seriadas y por lo menos 1000 células en total en cada tejido estudiado.

IV. ESTUDIOS DE INFECCION CON BAJAS DOSIS DE PARASITOS

Con el fin de definir la cinética de producción de lesiones con bajas dosis de parásitos, se inocularon lotes de ratones de 21-25 días de edad, con 10, 1×10^2 , 1×10^3 y 1×10^4 tripomastigotes de una u otra cepa de *T. cruzi*, por vía iv. Se eligió esta vía ya que sería la empleada en los estudios de transferencia pasiva de subpoblaciones de linfocitos T. En estos ratones se determinó la parasitemia mediante microhematocrito o lectura en hemocitómetro, y se realizaron estudios histológicos con el fin de detectar los cambios histopatológicos. El seguimiento parasitológico se efectuó entre los 4 y 30 días pi y se obtuvieron muestras de músculo isquiotibial, nervio ciático y médula espinal para la realización de los estudios histológicos, y suero para la realización de estudios serológicos (IFI y AD) en ese lapso.

V. ESPECIFICIDAD ANTIGENICA DE LAS SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T

Con el fin de determinar los antígenos tisulares reconocidos por las subpoblaciones de linfocitos T CD4 y CD8 de ratones infectados con una u otra cepa de *T.cruzi*, se purificaron dichas subpoblaciones y se determinó la especificidad estos linfocitos frente a concentraciones óptimas de antígeno que estimulaban la incorporación de timidina tritiada (^3H -TdR) al ADN.

V.A. PURIFICACION DE SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T

V.A.1. *OBTENCIÓN DE CELULAS MONONUCLEARES*

El bazo y los ganglios linfáticos poplíteos, axilares e inguinales se extrajeron en condiciones de esterilidad, de ratones C3H/HeN normales o infectados crónicamente con el clon K-98 de CA-I o con la cepa RA. Los órganos se colocaron en placas de Petri sobre baño de hielo, conteniendo medio RPMI 1640 adicionado de 10% de suero fetal bovino, antibióticos (gentamicina 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y penicilina 100 UI/ml) y bicarbonato de sodio, pH 7,2 (RPMI). Mediante un homogeneizador de vidrio previamente enfriado a 4°C se obtuvo una suspensión celular que fue filtrada a través de gasa estéril para quitar los restos de cápsulas de tejido conectivo y debris celular. La suspensión de células aisladas se centrifugó a 200xg durante 10 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento se trató con solución de lisis de eritrocitos (buffer Tris.ClH 0,05 M, conteniendo 0,83% CINH_4 , pH 7,2) durante 10 min a 20°C. Los leucocitos se diluyeron inmediatamente en RPMI a 4°C y se lavaron dos veces por centrifugación a 200xg durante 10 min a 4°C. Las condiciones de lavado de las células en todos los procedimientos posteriores, fueron las aquí enunciadas, salvo que se especifiquen otras. Para determinar la concentración y viabilidad celular se realizó el recuento de leucocitos en cámara de Neubauer, en una alícuota incubada 1 min en presencia de Azul Trypan 0,33% en PBS (concentración final). Este procedimiento se repitió en todos los pasos de purificación hasta la obtención del fenotipo celular deseado.

V.A.2. *DEPLECION DE MACROFAGOS*

Los macrófagos se eliminaron mediante la técnica de Mishell y col. (1980) ó mediante adherencia a superficies de plástico o vidrio (Walker, 1981). En el primer caso, las suspensiones celulares se ajustaron a 5×10^7 células/ml y se sembraron 4 a 5 ml en una jeringa de 50- 60 ml conteniendo 30-35 ml de Sephadex G-10 equilibrado en RPMI. Luego que todas las células ingresaran al lecho del gel se comenzó a agregar PBS conteniendo 5% de albúmina sérica bovina (ASB) en alícuotas de 2 ml. El flujo se mantuvo a 1 ml/min durante todo el procedimiento. Cuando la fracción celular

alcanzó el extremo inferior de la columna, se recogieron 20 ml de la suspensión sobre hielo. La suspensión celular eluida de la columna (linfocitos) se centrifugó a 200xg durante 10 min y se resuspendió en RPMI a una concentración de 2×10^7 células/ml. En el caso de la eliminación de macrófagos por adhesión a superficies, las suspensiones de células mononucleares se incubaron dos veces durante 45 min a 37°C en atmósfera de 5% CO₂.

Las células no adherentes al Sephadex o a las superficies plásticas o vítreas (linfocitos) se analizaron para evaluar la contaminación con macrófagos.

V.A.3. ANALISIS DE LAS CELULAS NO-ADHERENTES

El porcentaje de macrófagos contaminantes en la suspensión de linfocitos se determinó analizando mediante IFI la presencia de células CD11b⁺. Una alícuota de la suspensión, conteniendo 2×10^6 células, se incubó en baño de hielo durante 30 min con anti-CD11b en la dilución óptima como Ac primario. Como diluyente se empleó PBS conteniendo 1% ASB y 0,1% de N₃Na (PBS-N₃Na), en un volumen final de 1 ml. Luego de lavar las células para eliminar el exceso de Ac, las mismas se incubaron en baño de hielo con FITC-anti-rata (Sigma) diluido en PBS-N₃Na, como Ac secundario. El exceso de FITC-anti-rata se eliminó mediante dos lavados. El porcentaje de células CD11b⁺ (macrófagos) se determinó mediante observación en un microscopio de fluorescencia Zeiss modelo Standard provisto de un condensador para epifluorescencia modelo IV FI epi, filtros excitadores de 450 nm (LP450) y 490 nm (KP490), divisor cromático de 510nm (FT 510) y filtro emisor de 520 nm (LP 520).

V.A.4. DEPLECION DE LINFOCITOS B

Placas de Petri plásticas estériles de grado bacteriológico fueron sensibilizadas con Ac de cabra anti-inmunoglobulina (anti-Ig) de ratón. Con este fin 10 ml de anti-Ig (10 µg/ml en buffer CO₃Na₂/CO₃HNa 0,05 M, pH 9,5) se colocaron en las placas y se incubaron 24 horas a 4°C sobre una superficie plana perfectamente nivelada. Luego de la sensibilización el líquido se removió esterilmente, conservándose a 4°C para su reutilización (hasta 2 veces). El exceso de Ac se eliminó mediante tres lavados con PBS-N₃Na. La suspensión de linfocitos se ajustó a una concentración de 2×10^6 células/ml y se incubó en las placas durante 30 min a 4°C. El volumen máximo empleado fue de 10 ml/placa (2×10^7 células). Las células no adherentes, enriquecidas en linfocitos T, se recolectaron para su posterior análisis y fraccionamiento.

V.A.5. ANALISIS DE LA EFICIENCIA DE DEPLECION DE LINFOCITOS B

El fenotipo de las células no adherentes se confirmó mediante IFI empleando un AcM de rata contra un marcador pan-T de ratón (Thy1.2) como Ac primario y FITC-anti-rata como Ac secundario. Las células no adherentes (Ig⁻) se analizaron mediante IFD con Ac anti-IgM y anti-IgG de ratón para determinar la contaminación con linfocitos B contaminantes.

V.A.6. SELECCION DE LITCOOPERADORES (CD4⁺) Y LITCITOTOXICOS (CD8⁺)

La suspensión celular enriquecida en LT se ajustó a 2×10^7 células/ml. Para purificar las subpoblaciones se empleó indistintamente selección positiva o negativa, como se indica a continuación:

- a) Los linfocitos T se incubaron durante 30 min sobre baño de hielo, en presencia de AcMo de rata contra CD8 ó CD4 (Becton-Dickinson), a una concentración de 2,5 µg/ml. Alternativamente se emplearon diluciones óptimas de los sobrenadantes de los hibridomas de rata 53-6.72, que secreta IgG2a específica para todos los alelos de CD8 (TIB 105, American Type Culture Collection, ATCC) y GK1.5, que secreta IgG2b específica para L3T4 (CD4) (TIB 207, ATCC). Las diluciones óptimas de los sobrenadantes de los hibridomas se establecieron previamente sobre suspensiones de células totales viables de bazo y ganglio, libres de eritrocitos).
- b) Luego de lavar las células para eliminar el exceso de AcMo, se sembraron sobre placas de Petri plásticas sensibilizadas 24 horas antes con Ac de cabra anti-IgG de rata (10 µg/ml), de manera similar a lo indicado para la eliminación de linfocitos B.
- c) En los protocolos de selección negativa las células no adherentes se lavaron y ajustaron a 1×10^8 células/ml en RPMI, empleándose para estudios de transferencia pasiva.
- d) Para recolectar las células adherentes (selección positiva) se agregó a las placas de Petri PBS conteniendo 1% ASB, y se incubaron a 37°C (5% CO₂) durante 30 min. Luego, las células se desprendieron mediante pipeteo suave.
- e) Las células recolectadas se lavaron en RPMI y ajustaron a 1×10^8 células/ml en RPMI empleándose para estudios de transferencia pasiva.

V.A.7. ANALISIS DEL FENOTIPO SELECCIONADO

El fenotipo de las células adherentes y no adherentes se determinó mediante IFI empleando anti-CD8 ó anti-CD4 purificados por afinidad (Becton-Dickinson) como Ac primarios y FITC-anti-rata como Ac secundario.

V.B. ESTUDIOS DE PROLIFERACION LINFOCITARIA FRENTE A AUTO-ANTIGENOS

V.B.1. TEJIDOS

Dado que la intención era establecer si en nuestro modelo existen fenómenos de autoinmunidad asociados a las lesiones neuromusculares observadas durante la infección, se decidió seleccionar tejido muscular y nervioso como Ag en los ensayos de proliferación.

V.B.1.a. Obtención de Antígenos (Ag): Se prepararon fracciones solubles totales de músculo esquelético, nervio ciático y médula espinal de ratones C3H/HeN normales.

Los tejidos obtenidos en condiciones asépticas fueron colocados sobre baño de hielo en cápsulas de Petri conteniendo PBS, cortados en pequeños fragmentos con bisturí, y lavados por decantación para eliminar los restos de sangre. Los tejidos se homogeneizaron empleando un homogeneizador eléctrico (Virtis). El material obtenido se sometió a 10 ciclos de congelación/descongelación, luego de lo cual el debris tisular se separó de la fracción soluble mediante centrifugación a 5000 x g durante 15 min. En algunas ocasiones se empleó sonicación en lugar de congelación/descongelación (10 ciclos a 60 Hz durante 10 seg, con lapsos de 1 min de reposo entre ciclos). El material obtenido se esterilizó por filtración a través de membranas de acetato de celulosa (0,22 μ m), se fraccionó en alícuotas y se congeló a -70°C hasta su uso.

V.B.1.b. Concentración proteica de las preparaciones antigénicas: Se determinó mediante la técnica de Lowry y col. (1951). Como estándar se empleó una solución de ASB fracción V (1 mg/ml).

V.B.2. ENSAYOS DE PROLIFERACION

V.B.2.a. Células efectoras: Se purificaron LT CD4 y CD8 de ratones C3H/HeN normales o infectados con RA ó K-98, de acuerdo al método explicado en la Sección IV.A. La concentración se ajustó a 1×10^6 células/ml.

V.B.2.b. Células presentadoras de Ag: Las mismas se pueden obtener a partir de células mononucleares de bazo mediante radiación γ (Chesnut y Gray, 1981) o por tratamiento con venenos mitóticos, como la mitomicina C (mitC) (Aune y Pogue, 1989). En la presente Tesis se empleó esta última alternativa.

La concentración óptima de mitC necesaria para inhibir la proliferación celular se determinó evaluando la proliferación de células tratadas con distintas concentraciones de mitC y

controles no tratados, en presencia de 5 µg/ml de concanavalina A (ConA), un mitógeno de linfocitos T obtenido de la planta Cannavalia ensiformis. Se empleó como inhibidora la mínima concentración de mitC capaz de impedir la proliferación inducida por ConA. El protocolo empleado se detalla a continuación:

Se ajustó una suspensión de células mononucleares de bazo a 2×10^7 células/ml. Un ml de dicha suspensión se incubó a 37°C en presencia de 0, 10, 20, 40 y 80 µg/ml mitC (concentración final) en RPMI 1640 sin suero. Luego, las células se lavaron tres veces con RPMI conteniendo SFB al 5%, para eliminar el exceso de mitC. La concentración celular se ajustó a 1×10^5 CA/ml.

V.B.2.c. Estimulación: Se agregaron 100 µl de la suspensión de células accesorias (1×10^4 células) a policubetas de 96 hoyos con fondo plano Nuncion (Nunc, Roskilde, Dinamarca). Los antígenos ensayados, fueron diluidos de manera de obtener las siguientes concentraciones proteicas finales en el cultivo: 0, 5, 10 y 20 µg/ml. Cincuenta µl de la solución de antígeno fueron agregados a las células accesorias e incubadas (60 min, 37°C, 5% CO₂). Luego se agregaron 100 µl de la suspensión de LT CD4 ó CD8. Se prosiguió el cultivo durante 6 días.

V.B.2.d. Pulso de ³H-Timidina: Al sexto día se agregaron 20 µl de RPMI conteniendo 1 µCi de ³H-TdR (50 µCi/ml) a cada pocillo y la incubación se continuó durante 18 horas, luego de las cuales las células fueron cosechadas con un cosechador de células Nunc-8 (Nunc) sobre filtros de papel/fibra de vidrio. Los filtros se secaron entre papeles de filtro Whatman N° 1 y se colocaron en viales de polipropileno conteniendo líquido de centelleo (PPO, 4 g/l y POPOP 100 mg/l, en tolueno). Los viales plásticos se pusieron dentro de viales de vidrio y la lectura se efectuó en un contador de centelleo líquido RackBeta 1214 (Pharmacia, Uppsala, Suecia). Los resultados se expresaron en desintegraciones/minuto (dpm), efectuando las correcciones necesarias de las cuentas/minuto (cpm) para el «quenching», realizándose las lecturas frente al estándar externo del contador. Los resultados se almacenaron emulando el programa incorporado del contador de centelleo.

VI. ESTUDIOS DE TRANSFERENCIA PASIVA DE SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T

Una vez establecido el perfil fenotípico de las poblaciones celulares inmunocompetentes en las lesiones de los ratones infectados, se estudió la responsabilidad de los linfocitos T CD4 y CD8 en el desencadenamiento de la injuria tisular. Para ello se procedió a purificar las subpoblaciones mencionadas a fin de transferirlas a ratones receptores singeneicos normales. En estos ratones se realizaron estudios electrofisiológicos, histológicos e inmunohistoquímicos de manera similar a la detallada en los estudios de infección.

Las características de los Ac empleados en la purificación de las células de los ratones dadores y en los estudios inmunohistoquímicos de los ratones receptores son las que se detallaron en la sección V. Las diluciones óptimas para los estudios analíticos o preparativos se establecieron mediante inmunofluorescencia empleando suspensiones de células viables de bazo y ganglio.

VI.A. TRANSFERENCIA DE CELULAS

Las subpoblaciones de linfocitos T CD4 y CD8 (1×10^8 células/ml) purificadas de acuerdo a lo indicado en la Sección V se inocularon por vía iv en el seno retroorbital de ratones C3H/HeN normales de 21 días de edad (0,1 ml/ratón, 1×10^7 células).

A distintos tiempos pt (ver Resultados) los receptores se sacrificaron por anestesia con éter etílico. Se obtuvieron muestras de músculo isquiotibial, nervio ciático y médula espinal para estudios histopatológicos (H&E) e inmunohistoquímicos (detallados en la Sección I).

VI.B. CONTROLES DE CO-INFECCION

VI.B.1. *DETECCION DE INFECCION EN RATONES LACTANTES*

Para descartar la posibilidad de que las lesiones en los ratones receptores, fueran causadas por pequeñas cantidades de parásitos presentes en las suspensiones celulares transferidas, se realizó la inoculación de las mismas en ratones lactantes de 10 días de edad, los cuales son altamente susceptibles a la infección por ambas cepas. En los ratones inoculados se realizó el seguimiento parasitológico (MHT) y serológico (IFI, AD) hasta los 30 días, al cabo de los cuales los ratones se sacrificaron para realizar estudios histológicos (H&E) e inmunohistoquímicos (IFI) para detectar T.cruzi.

VI.B.2. *DETECCION DE ADN DE T.CRUZI*

Como control adicional de infección se procedió a purificar ADN total a partir de tejidos de los ratones receptores de linfocitos T, para intentar detectar la presencia de ADN de T.cruzi empleando la técnica de PCR y corriendo los productos de la amplificación en geles de poliacrilamida.

VI.B.2.a. Purificación del ADN total: Muestras de músculo esquelético, nervio ciático, médula espinal y bazo se homogeneizaron en homogeneizadores de vidrio enfriados en nitrógeno líquido. Cinco volúmenes de buffer de lisis (10 mM Tris-ClH, pH 7,6; EDTA, 10 mM; ClNa, 0,1 M; SDS 0,5%; proteinasa K, 300 µg/ml) se agregaron a las muestras y se incubaron toda la noche a

37°C y 3 hr a 55°C. Luego de la incubación las muestras se centrifugaron para remover el debris celular. Se separaron los sobrenadantes y se realizaron dos extracciones de los mismos con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). El ADN se precipitó a partir de la fase acuosa mediante el agregado de 1/10 (V/V) acetato de sodio 3 M (pH 5,5) y 2 volúmenes de etanol frío. Luego de centrifugar durante 15 min a 5.000 rpm, el sedimento se lavó con etanol 70%, se secó en un liofilizador y se resuspendió en 10 µl de agua destilada.

VI.B.2.b. Amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR): Las ampli-ficaciones se prepararon en 50 µl de cócteles que contenían: 10 mM Tris-ClH (pH 8,3), 50 mM ClK, 1,5 mM Cl₂Mg, 0,01% de gelatina, 200 µM de cada uno de los cuatro NTP (ATP, CTP, TTP y GTP), 1,25 U de Taq polimerasa (Perkin-Elmer-Cetus Corp., USA) y 10 µM de cada uno de los iniciadores TCZ1 y TCZ2 descritos por Moser y col. (1989). Cinco µl (1 µg) de templado (ADN extraído de los tejidos) se agregaron a los cócteles y se cubrieron con aceite mineral. La PCR consistió en los siguientes pasos:

1. Desnaturalización inicial del ADN: 5 min a 95°C.
2. Venticinco ciclos de amplificación con el siguiente perfil:
 - a) Desnaturalización del templado: 30 seg a 94°C.
 - b) Apareamiento de los iniciadores: 90 seg a 60 °C.
 - c) Extensión de los iniciadores apareados al templado: 2 min a 72°C.

Finalizado el último ciclo las muestras se incubaron durante 3 min adicionales a 72 °C y luego se enfriaron a 4°C.

VI.B.2.c. Análisis de los amplicones: Veinte µl de cada muestra se corrieron en un gel de poliacrilamida (8,4%) en buffer TBE (0,09 M Tris, 0,09 M ácido bórico, 4 mM EDTA). El gel se tiñó con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) durante 40 min. Luego se lavó con agua destilada y se observó bajo un transiluminador.

RESULTADOS

I. ESTUDIOS DE INFECCION EN RATONES C3H/HeN

En un estudio longitudinal realizado previamente en ratones Rockland infectados con la cepa CA-I de *T.cruzi* se había determinado cuáles eran las alteraciones electrofisiológicas e histopatológicas en el sistema nervioso periférico y músculo esquelético (Losavio y col., 1989). Tomando este trabajo como punto de partida para esta Tesis, se seleccionaron tres tiempos pi, 15 (fase aguda), 120 (fase crónica temprana) y 270 días (fase crónica tardía), con fin de comparar la progresión de las lesiones neuromusculares en ratones endocriados C3H producidas por dos cepas de *T.cruzi*. La elección de esta línea de ratones se decidió a partir de estudios electromiográficos previos que demostraron la existencia de alteraciones de tipo miopático en ratones C3H infectados con la cepa CA-I y de tipo neuropático en los infectados con RA (Sanz y col., 1991).

I.A. INFECTADOS CON LA CEPA CA-I

I.A.1. *ELECTROMIOGRAFIA*

En la etapa aguda (15 días pi) 80% de los ratones presentaron actividad espontánea, fibrilación y potenciales positivos. Los valores de amplitud y duración de los PUM, así como el porcentaje de potenciales polifásicos en los animales infectados con esta cepa fueron normales (Tabla 1).

En la fase crónica temprana (120 días pi) no se registraron modificaciones en la actividad espontánea, y los valores de amplitud y duración no difirieron de los registrados en los grupos controles (Tabla 1). Sin embargo, se observó polifasismo acentuado (que indica reinervación anterior al momento del estudio electromiográfico) en el grupo de ratones infectados vs. el grupo control (Tabla 1).

En la fase crónica tardía (270 días pi) tampoco se registró actividad espontánea, aunque sí reducción significativa en los valores de amplitud y duración de los PUM, en los ratones infectados con respecto a los controles normales (Tabla 1).

Estos resultados sugieren alteraciones de la unidad motora con predominio de patrón miopático.

TABLA 1: AMPLITUD Y DURACION DE LOS PUM Y PORCENTAJE DE PUM POLIFASICOS EN RATONES INFECTADOS CON CA-I Y RA

GRUPO	PARAMETRO ¹	DIAS PI		
		15	120	270
CONTROL	AMP	242,0±60,3	476,5±123,18	324,0±186,0
	DUR	1,89±0,18	1,91±0,10	4,58±0,84
	POL	16,4±0,6 n=56	15,32±1,17 n=69	29,26±2,31 n=59
CA-I	AMP	239,8±36,9	448,0±131,7	240,0±180,7*
	DUR	1,91±0,22	1,87±0,08	3,74±0,99***
	POL	15,7±0,9 n=43	51,32±0,94*** n=54	49,36±1,83*** n=47
RA	AMP	306,2±105,4***	841,7±362,3***	336,1±127,9
	DUR	2,04±0,38*	2,51±0,57***	4,46±0,39
	POL	28,38±0,15*** n=37	59,20±1,24*** n=58	26,8±2,47 n=54

¹AMP, amplitud (μV); DUR, duración (ms); POL, porcentaje de PUM polifásicos. n, número de PUM registrados.

*, P<0,05; ***, P<0,001.

I.A.2. HISTOLOGÍA

De manera similar a lo ya comunicado para ratones Rockland infectados con la cepa CA-1 (González Cappa y col., 1987; Losavio y col., 1989), se observó la presencia de vasculitis e infiltrados inflamatorios mononucleares de magnitud creciente en los ratones C3H/HeN infectados con esta cepa de *T.cruzi*, en todos los tejidos a lo largo del estudio.

I.A.2.a. Músculo isquiotibial: En los estudios histológicos de la línea endocriada de ratones se detectaron infiltrados con localización intersticial y perivascular. Los infiltrados, inicialmente focales, progresaron en intensidad durante la fase crónica, comprometiendo la histoarquitectura muscular por la necrosis miofibrilar y la fibrosis subsiguiente (Figuras 1A y 1B, Tabla 2).

En este tejido se detectaron nidos de amastigotes desde la fase aguda, no siempre asociados a focos inflamatorios (Figura 1C y Tabla 3).

I.A.2.b. Nervio ciático: Al igual que con la línea de ratones Rockland (Losavio y col., 1989), en los ratones C3H/HeN se observaron infiltrados epi-, peri- y endoneurales desde la fase aguda, de severidad creciente con la progresión de la infección (Figura 2A). En el período crónico se detectaron cámaras de digestión de mielina -signo de degeneración axonal- (Figura 2A). Por otra parte no se encontraron nidos de amastigotes de *T.cruzi* (Tabla 3).

I.A.2.c. Médula espinal: De manera similar a lo observado en ratones exocriados (Losavio y col., 1989), los infiltrados se componían de células mononucleares que comprometían los ganglios dorsales y las raíces espinales (2B), en tanto las sustancias blanca y gris estaban conservadas. Al igual que en nervio no se detectaron nidos de amastigotes.

I.A.3. INMUNOHISTOQUÍMICA

Los linfocitos T fueron la población celular predominante en todos los tejidos y tiempos pi estudiados, excepto en nervio ciático a los 270 días pi. Los resultados no mostraron diferencias significativas entre los ratones infectados y tratados con benznidazol y los no sometidos al tratamiento.

I.A.3.a. Músculo isquiotibial: Se observó predominio de linfocitos T CD4 sobre CD8 en las fases aguda y crónica temprana (Figuras 3A y 4A). Por el contrario, en la fase crónica tardía los linfocitos T CD8 fueron la subpoblación mayoritaria. A este tiempo pi se detectaron escasos linfocitos B con IgM de superficie (sIgM), ausentes en períodos más tempranos de la infección (Figura 3A).

Figura 1A: Lesion muscular en un ratón C3H/HeN infectado con la cepa CA-I de T.cruzi (120 días pi). Se observa un intenso infiltrado perivascular (flecha llena) e intersticial comprometiendo la histoarquitectura. Muchas de las fibras musculares presentan centralización nuclear (punta de flecha hueca) o han sufrido "splittings" (punta de flecha llena). H&E, 250x.

Figura 1B: Lesión muscular en un ratón C3H/HeN infectado con la cepa CA-I (120 días pi). Intenso infiltrado perivascular que compromete un nervio intramuscular (flecha hueca).H&E, 250x.

Figura 1C: Nido de amastigotes en un ratón C3H/HeN a los 15 días de infección con la cepa CAI (punta de flecha llena). Nótese la ausencia de infiltrado inflamatorio alrededor de la fibra muscular infectada y el incipiente infiltrado perivascular (punta de flecha hueca). H&E, 400x.

FIGURA 1: COMPROMISO MUSCULAR EN RATONES C3H/HeN INFECTADOS CON CA-I

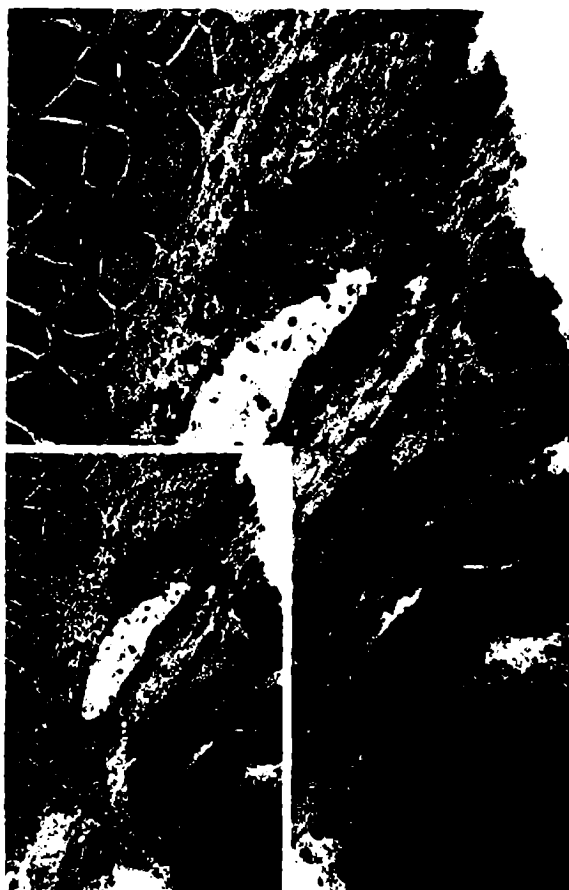
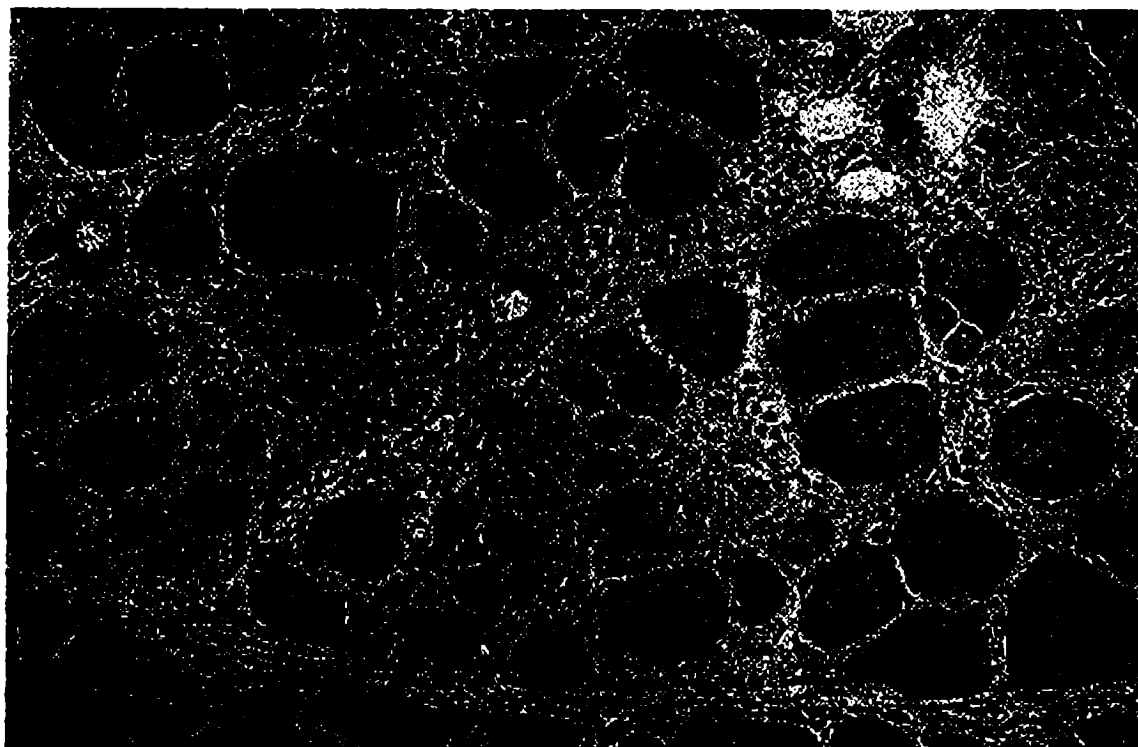


TABLA 2: ALTERACIONES HISTOLOGICAS OBSERVADAS EN MÚSCULO ESQUELETICO.

PARAMETRO	CEPA					
	CA-I			RA		
	DIAS PI			DIAS PI		
	15	120	270	15	120	270
INTENSIDAD DEL INFILTRADO ¹	+	+++	+++	+	++	++
CENTRALIZACION NUCLEAR ²	A	+++	+++	A	++	++
ATROFIA MIOCELULAR ³	A	A	AGR	A	AIS/AGR	AGR
FIBROSIS Y REEMPLAZO GRASO ⁴	A	++	+++	A	+	++
OBSTRUCCION VASCULAR ⁵	A	+	+++	A	+	++

¹+, infiltrados focales dispersos mayoritariamente perivasculares (área < 25%); ++, infiltrados nodulares no coalescentes (25% < área < 50%); +++, infiltrados nodulares coalescentes (área > 50%).

^{2,4,5}A, ausente; +, leve; ++, moderada; +++, intensa.

³A, ausente; AIS, atrofia aislada; AGR, atrofia agrupada.

Figura 2A: Epi- y perineuritis en un ratón C3H/HeN infectado con la cepa CA-I (120 días pi). En el centro del campo se observa una cámara de digestión de mielina (punta de flecha hueca). El inserto muestra el intenso compromiso endoneural.

Figura 2B: Compromiso inflamatorio leve de las raíces espinales en un ratón C3H/HeN infectado con CA-I (270 días pi).

**FIGURA 2: COMPROMISO DE TEJIDO NERVIOSO
EN RATONES C3H/HeN INFECTADOS CON CA-I**

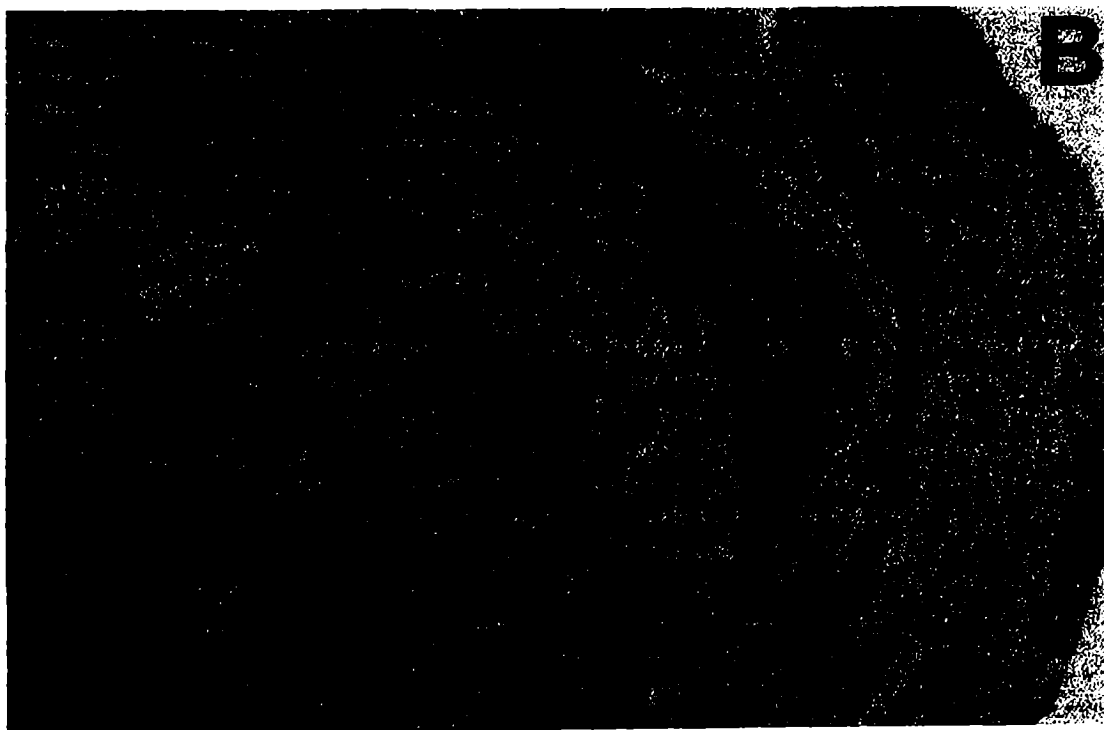
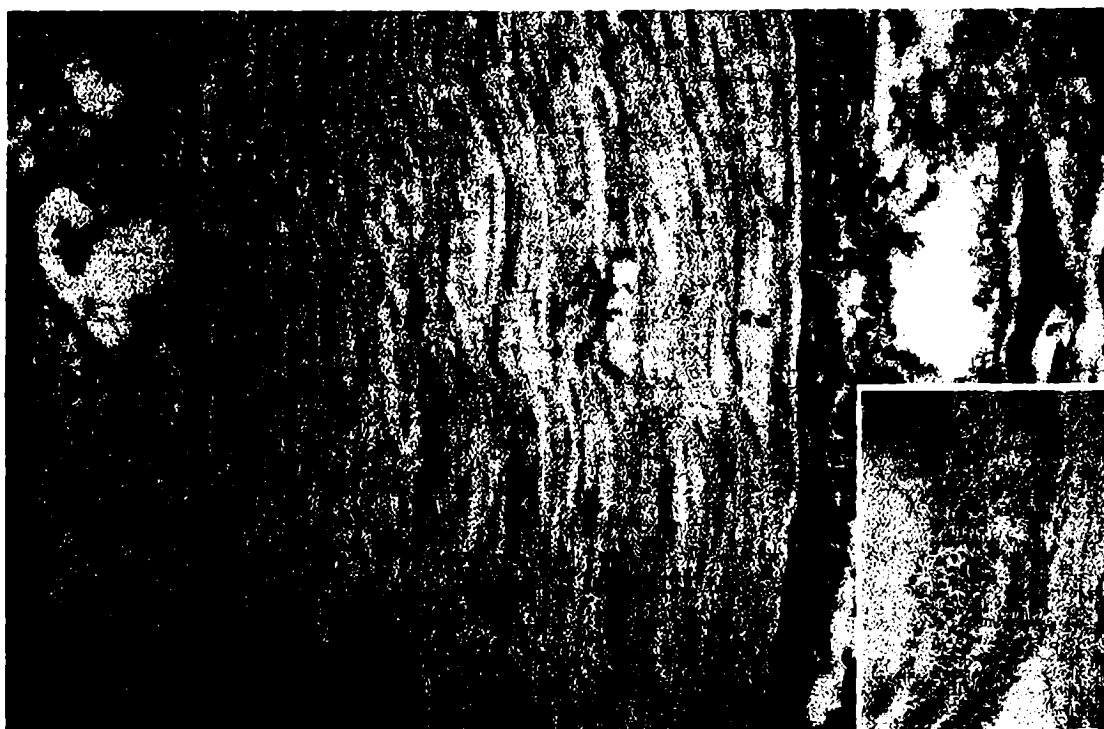


TABLA 3: CUANTIFICACION DE NIDOS DE AMASTIGOTES EN MUSCULO ESQUELETICO Y NERVIO CIATICO.

DIAS PI	TEJIDO			
	MUSCULO		NERVIO CIATICO	
	CA-I	RA	CA-I	RA
15	63±4 ¹	35±3	0	19±3
120	210±15	120±11	0	61±8
270	17±3	10±2	0	21±3

¹Media±DE de 100 campos (400x) en cuatro secciones diferentes (IFI).

Figura 3: Fenotipo de las poblaciones celulares en los infiltrados inflamatorios de músculo esquelético en ratones C3H/HeN infectados con CA-I (A) y RA (B).

FIGURA 3: FENOTIPOS CELULARES EN MUSCULO

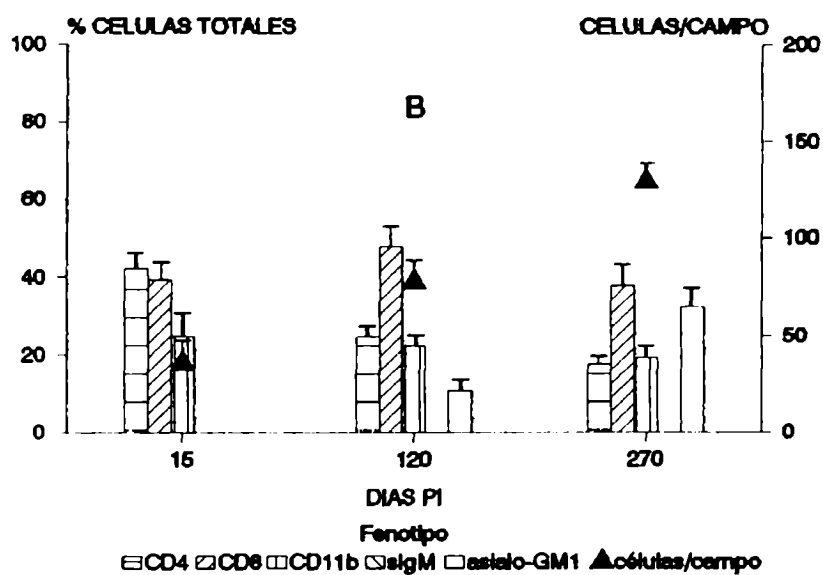
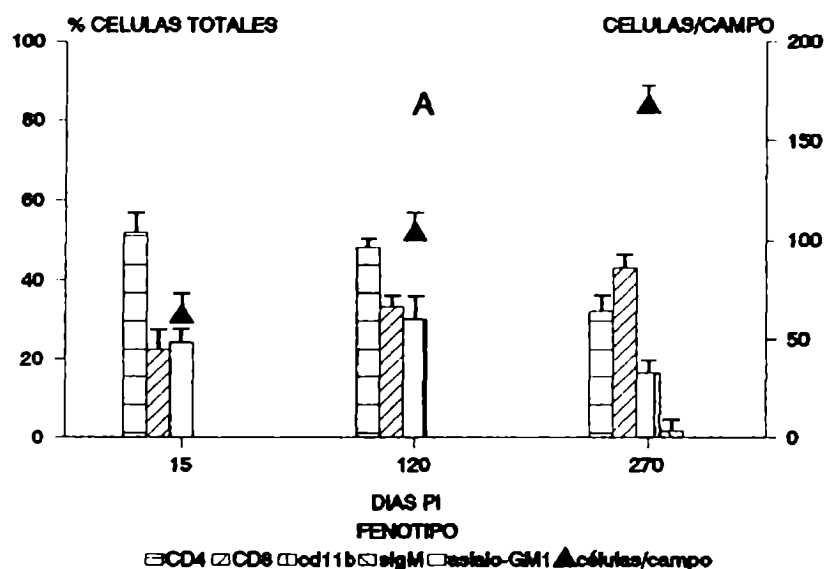
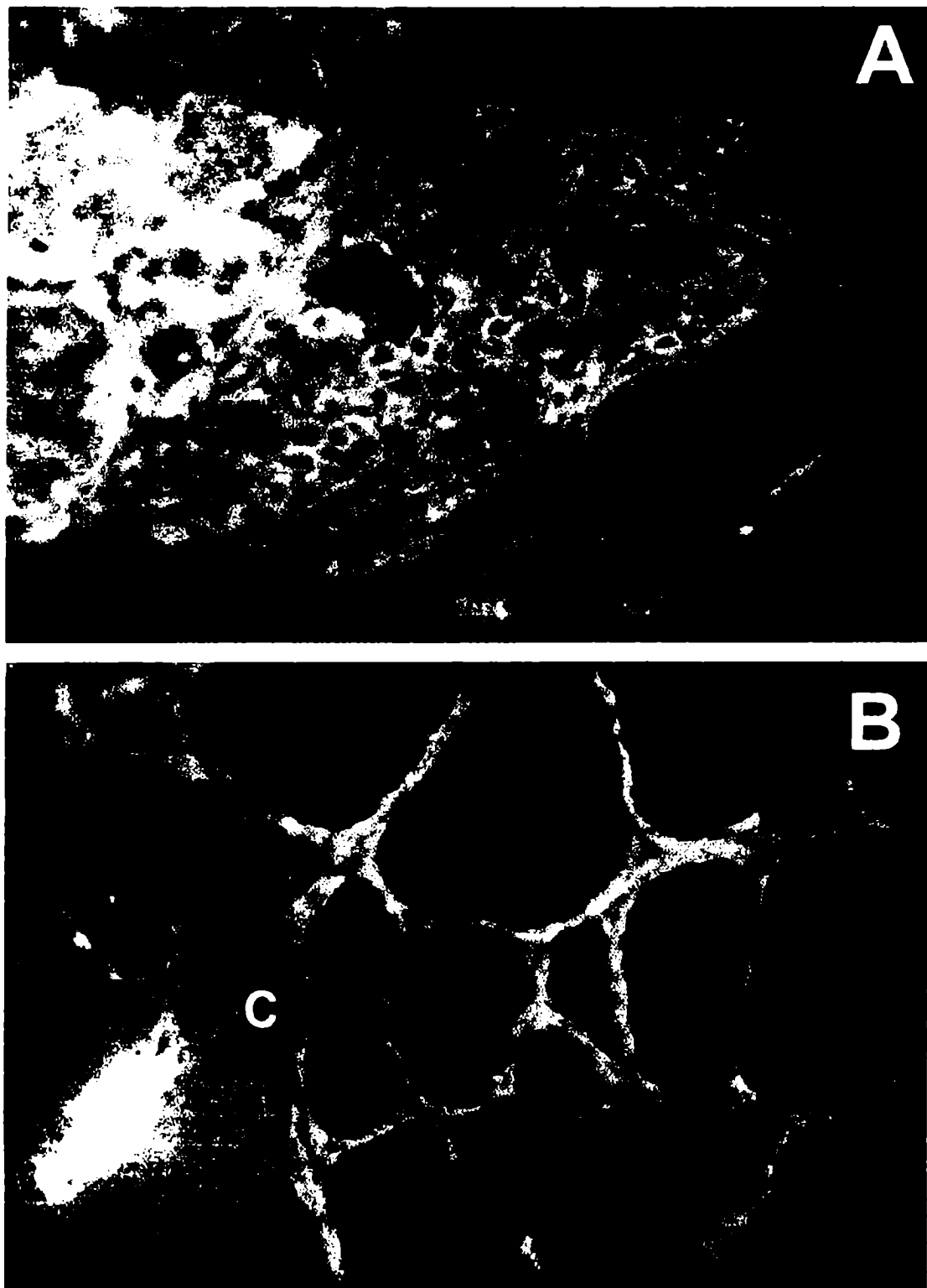


Figura 4A: Infiltrado perivascular e intersiticial con predominio de linfocitos T CD4 en un ratón C3H/HeN crónicamente infectado (120 días pi) con CA-I (IFI, 400x).

Figura 4B: Depósitos de IgG en el intersticio muscular en un ratón C3H/HeN a los 120 días pi con la cepa CA-I (IFI, 400x).

Figura 4C: Fibra muscular en la que se observa reactividad para Ag de T.cruzi a los 120 días pi (IFI, 400x).

**FIGURA 4: CARACTERIZACION FENOTIPICA DE LAS
LESIONES MUSCULARES EN RATONES C3H/HeN
INFECTADOS CON CA-1**



En todos los tiempos estudiados se detectó la presencia variable de células CD11b⁺ (macrófagos) (Figura 3A).

El estudio de componentes humorales en las lesiones permitió detectar depósitos de IgG en el intersticio de las fibras musculares en ratones crónicamente infectados, sólo a los 120 días pi (Figura 4B). En ningún caso se hallaron depósitos de de IgM o C3.

El análisis de inmunofluorescencia empleando IgG anti-Tc permitió detectar Ag parasitario (Figura 4C). Como era de esperar, el análisis de cortes histológicos mediante H&E presentó una sensibilidad menor para la detección de parásitos, por lo que la cuantificación se realizó empleando métodos inmunohistoquímicos. La presencia de parásitos fue mayor a los 120 días pi que en los otros tiempos estudiados (Tabla 3).

I.A.3.b. Nervio ciático: No se encontraron diferencias significativas en los porcentajes de linfocitos T CD4 y CD8 a los 15 y 120 días pi (Figura 5A).

A los 270 días pi tanto los linfocitos B con IgM de superficie (sIgM⁺) como los macrófagos representaban las poblaciones mayoritarias en los infiltrados (Figura 5A, Figura 6).

En este tejido no se observaron depósitos de componentes humorales (IgM, IgG o C3) ni Ag parasitario.

I.A.3.c. Médula espinal: Durante la fase aguda la subpoblación de linfocitos T preeminente fue CD8⁺ (Figura 7A). Por otra parte no se registraron diferencias estadísticas entre las subpoblaciones de linfocitos T durante la fase crónica. En esta última, a los 270 días pi se detectó un bajo porcentaje de linfocitos sIgM⁺ (Figura 7A).

Al igual que en nervio ciático no se observaron depósitos de componentes humorales y ni Ag parasitario en este tejido.

I.B. INFECTADOS CON LA CEPA RA

Con el fin de determinar si durante el curso de la infección con una cepa de alta virulencia las características de las lesiones diferían de las observadas con una cepa que desarrolla una infección de curso crónico, se extendieron las observaciones a la cepa RA, altamente letal y reticulotrópica (Celentano y González Cappa, 1992).

Figura 5: Fenotipo de las poblaciones celulares en los infiltrados inflamatorios de nervio ciático en ratones C3H/HeN infectados con CA-I (A) y RA (B).

FIGURA 5: FENOTIPOS CELULARES EN NERVI

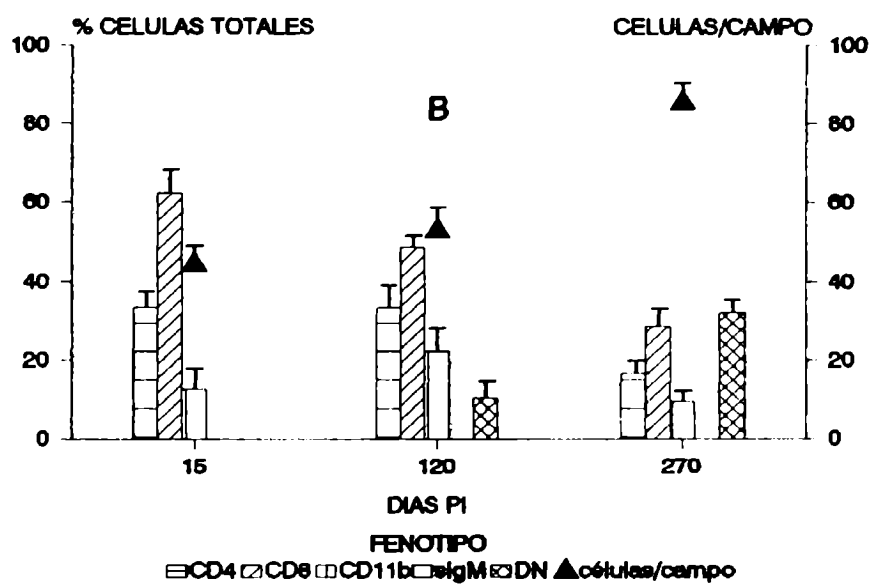
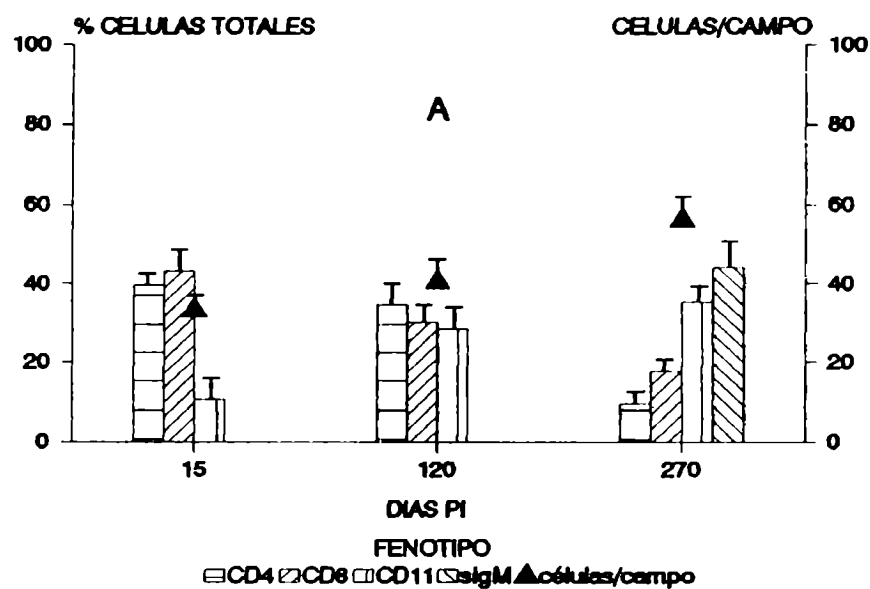


Figura 6: Presencia de linfocitos B (punta de flecha llena) en infiltrados endoneurales de un ratón C3H/HeN infectado con CA-I (270 días pi). Se observa una cámara de digestión de mielina (punta de flecha hueca). BAP/H&E, 400x.

**FIGURA 6: RATONES C3H/HeN INFECTADOS
CON CA-I: PRESENCIA DE LINFOCITOS B EN
NERVIO CIATICO**

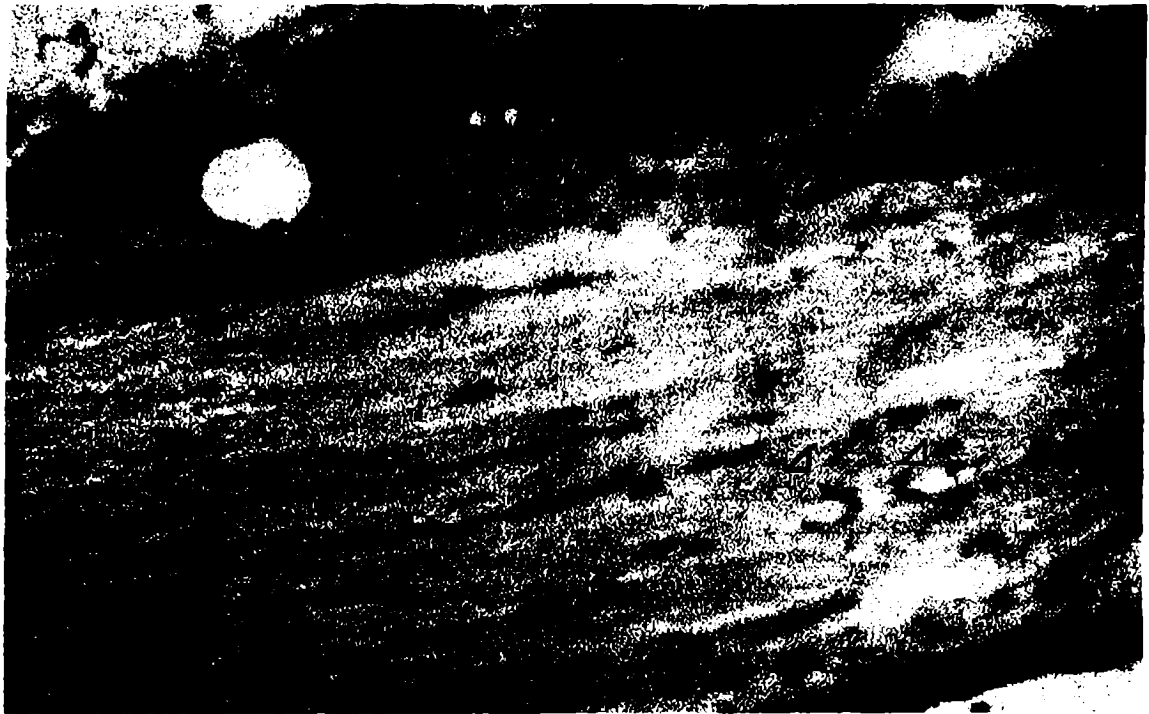
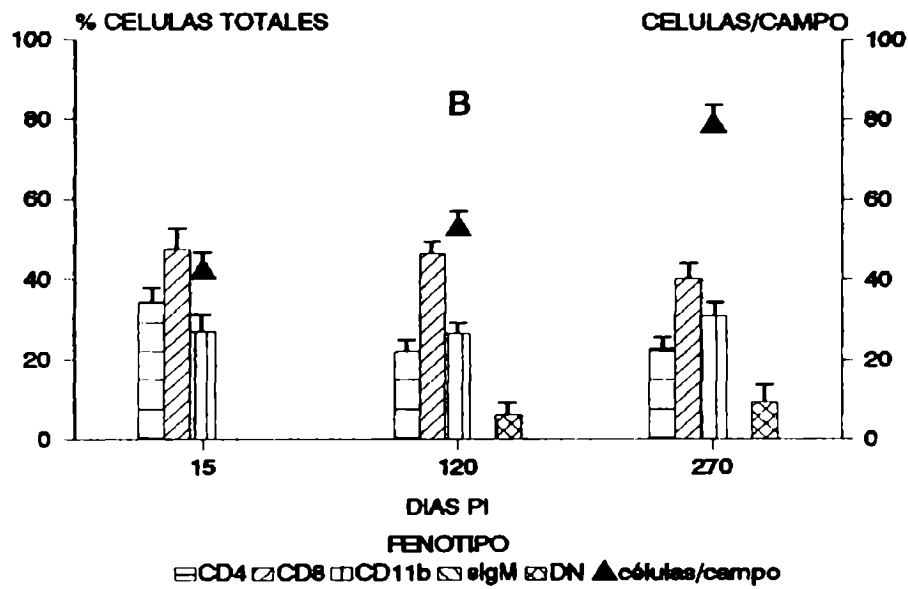
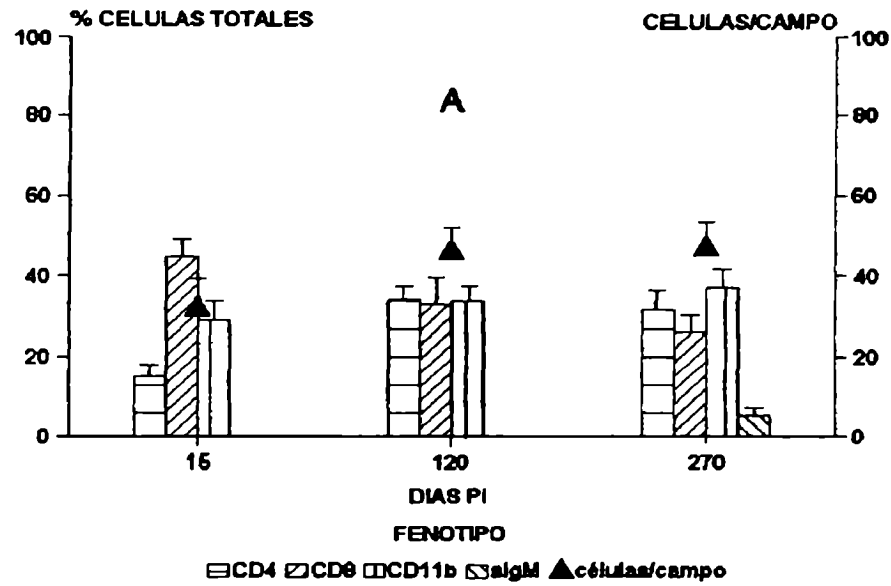


Figura 7: Fenotipo de las poblaciones celulares en los infiltrados inflamatorios de médula en ratones C3H/HeN infectados con CA-I (A) y RA (B).

FIGURA 7: FENOTIPOS CELULARES EN MEDULA



I.B.1. *ELECTROMIOGRAFIA*

La actividad espontánea fue evidente en 5 de 9 ratones a los 15 días pi. Los PUM presentaron amplitudes y duraciones significativamente aumentadas en el grupo de ratones infectados en comparación al grupo control (Tabla 1). El porcentaje de PUM polifásicos registrados (que indican reinervación anterior al momento del estudio) fue mayor en los ratones infectados que en los controles (Tabla 1). A los 120 días pi no se detectó actividad espontánea en el grupo de ratones infectados. La amplitud como la duración de los PUM y el porcentaje de PUM polifásicos también se hallaron significativamente aumentado con respecto a los controles (Tabla 1). A los 270 días pi 2/6 ratones infectados revelaron actividad espontánea que se manifestó como fibrilaciones. Tanto la amplitud como la duración de los PUM se aproximaron a los valores normales y el porcentaje de PUM polifásicos fue similar al del grupo control (Tabla 1).

I.B.2. *HISTOLOGIA*

Los tipos celulares predominantes en los infiltrados fueron linfocitos y macrófagos, al igual que en el caso de los ratones infectados con la cepa CA-I.

I.B.2.a. Músculo isquiotibial: Los infiltrados inflamatorios en los ratones infectados con la cepa RA no difirieron, con respecto al porcentaje de células mononucleares, de lo observado en ratones infectados con la cepa CA-I. Sin embargo, la extensión de los de los mismos fue menor en la mayoría de los animales analizados. Al igual que con la cepa miotrópica la vasculitis y la obliteración vascular progresiva fueron rasgos característicos de la infección con esta cepa de *T. cruzi* (Tabla 2). La progresión de las lesiones se acompañó de necrosis miofibrilar, fibrosis y reemplazo graso, de manera similar a lo observado con la cepa CA-I (Tabla 2).

En este tejido se detectaron nidos de amastigotes asociados a focos inflamatorios, al igual que en la infección por CA-I (Tabla 3). De manera similar a lo observado con esta cepa, la frecuencia de nidos fue mayor en la fase crónica temprana que en los otros tiempos estudiados (Tabla 3).

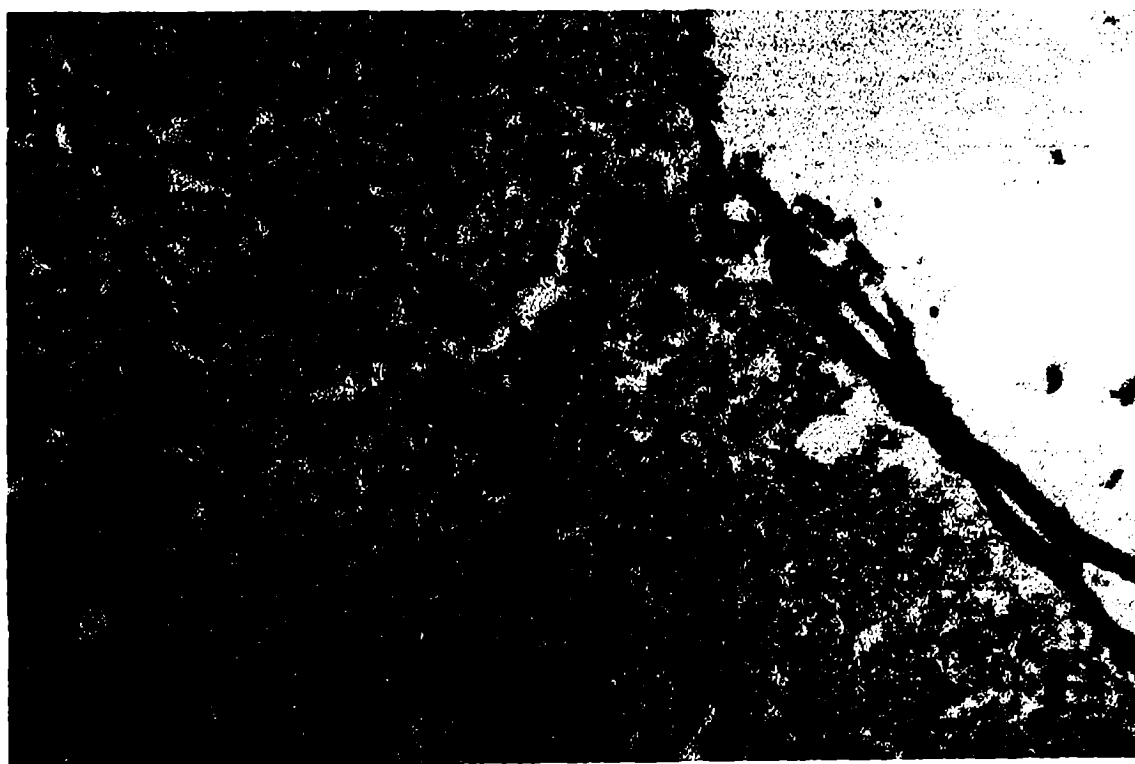
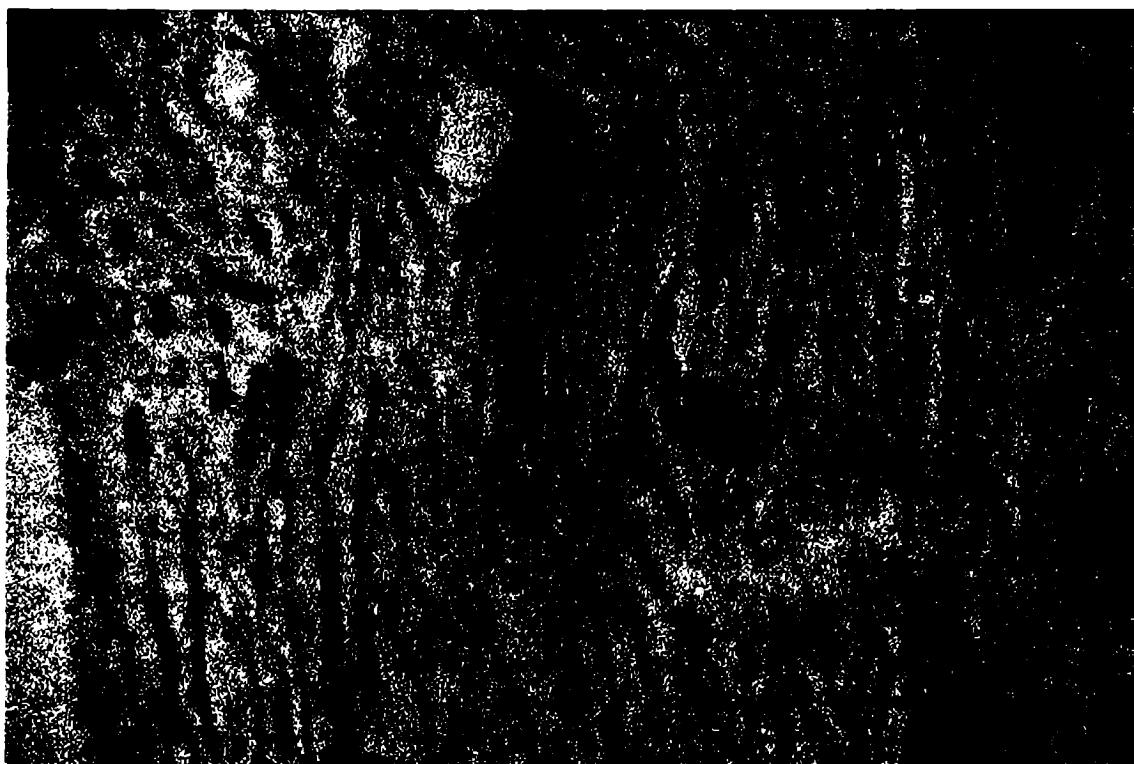
I.B.2.b. Nervio ciático: El rasgo sobresaliente de las lesiones encontradas fue la intensa perineuritis en la etapa inicial de la infección. Abundantes cámaras de digestión de mielina y nidos de amastigotes (Figura 8A) se observaron en la etapa crónica.

I.B.2.c. Médula espinal: En la etapa aguda se observaron infiltrados mononucleares leves, los que progresaron hacia una leptomeningitis crónica en etapas tardías de la infección (Figura 8B). En este tejido no se encontraron nidos de amastigotes.

Figura 8A: Nido de amastigotes (punta de flecha) en el nervio ciático de un ratón C3H/HeN infectado con la cepa RA (120 días pi). H&E, 400x.

Figura 8B: Leptomeningitis y vasculitis en un ratón C3H/HeN crónicamente infectado con RA. La sustancia blanca se halla conservada (120 días pi). H&E, 250x.

**FIGURA 8: COMPROMISO DE TEJIDO NERVIOSO
EN RATONES C3H/HeN INFECTADOS CON RA**



I.B.3. INMUNOHISTOQUIMICA

La población celular predominante en los infiltrados en todos los tejidos y tiempos estudiados fue la de linfocitos T, al igual que en el caso de los ratones infectados con CA-I. En los tejidos de ratones infectados con RA no se encontraron depósitos de C3, IgM o IgG, difiriendo en este último caso de lo observado en la infección por CA-I.

I.B.3.a. Músculo isquiotibial: Los linfocitos T CD8 predominaron sobre los CD4 durante la fase crónica temprana (120 días pi) y tardía (270 días pi) (Figura 3B). A estos tiempos pi se detectaron células NK (asialo-GM1+), las cuales representaban 10,8% y 23% de las células totales, respectivamente (Figura 3B). La Tabla 3 muestra los datos cuantitativos de la presencia de nidos de amastigotes en este tejido a los distintos tiempos pi analizados.

I.B.3.b. Nervio ciático: En este tejido se observó un predominio significativo de los linfocitos T CD8 sobre los CD4 durante todo el curso de la infección (Figura 5B). El 10% de total de células a los 120 días pi, y el 32 % a los 270 días pi, no fueron marcadas con los Ac utilizados. No se investigó la presencia de células NK, ya que sólo se disponía de un Ac contra asialo-GM1, presente en células NK, y componente normal del tejido nervioso. En este tejido se detectó Ag parasitario asociado a nidos de amastigotes (Tabla 3).

I.B.3.c. Médula espinal: En los infiltrados leptomeníngeos se observó predominio de linfocitos T CD8 sobre los CD4 a lo largo de todo el estudio en ratones infectados con RA (Figura 7B). En la fase crónica se registró disminución de linfocitos T citotóxicos y cooperadores a expensas de un aumento de células doble negativas (Figura 7B). Al igual que en nervio ciático, la presencia de antígeno asialo-GM1 en tejido nervioso impidió determinar si estas células eran NK.

II. ESTUDIOS DE PROLIFERACION LINFOCITARIA

Estos estudios se realizaron con la cepa RA y el clon K-98, que presenta las mismas características biológicas que la cepa CA-I de la cual fue obtenido, aunque es más estable en cuanto a estas características (p.ej., virulencia). Con ellos se intentó establecer si durante la etapa crónica de la infección la respuesta inflamatoria tisular se debía, al menos en parte, al reconocimiento de Ags propios del ratón por linfocitos T. Se realizaron ensayos de proliferación de subpoblaciones de células T, frente a Ag totales de los tejidos afectados (músculo esquelético, nervio ciático y médula espinal). En un estudio preliminar se determinaron las condiciones para la obtención de CPA.

II. A. DETERMINACION DE LA DOSIS DE MITOMICINA C INHIBITORIA DE LA PROLIFERACION

En la Tabla 4 se muestran resultados representativos de experimentos realizados con el fin de determinar la mínima dosis de MitC capaz de inhibir la proliferación celular en presencia de ConA, en un ensayo de siete días. De los resultados se deduce que la concentración óptima del veneno mitótico es de 40 $\mu\text{g/ml}$. Por lo tanto, ésta fue la concentración empleada para preparar CPA, en los ensayos de proliferación prente a Ag tisulares.

II. B. PROLIFERACION DE LINFOCITOS T DE RATONES INFECTADOS CON K-98

Los linfocitos de ratones infectados con K-98 proliferaron frente a todos los Ag ensayados. La magnitud de la proliferación fue baja y dependiente de la dosis. En ausencia de estímulo antigénico no se observó proliferación

II.B.1. *LINFOCITOS T CD4*: La máxima incorporación, (3.614 ± 356 dpm) se observó frente a homogenatos de músculo esquelético (Figura 9A).

II.B.2. *LINFOCITOS T CD8*: A diferencia de lo observado en el caso de linfocitos T CD4, en este caso la máxima incorporación de ^3H -TdR se obtuvo frente a homogenatos de nervio ciático (2599 ± 299 dpm, Figura 9A).

II. C. PROLIFERACION DE LINFOCITOS T DE RATONES INFECTADOS CON RA

Los linfocitos T de ratones infectados con esta cepa proliferaron exclusivamente frente a Ag de tejido nervioso, a diferencia de lo observado en el caso de K-98. Al igual que con el clon K-98 la incorporación de ^3H -TdR fue dependiente de la dosis de Ag y la proliferación fue nula en su ausencia (Figura 9B).

II.C.1. *LINFOCITOS T CD4*: La máxima respuesta proliferativa fue 14.171 ± 282 dpm, correspondiente al homogenato de nervio ciático (Figura 9B).

II.C.2. *LINFOCITOS T CD8*: Con esta población celular se obtuvieron resultados similares a los observados con linfocitos CD4. En este caso, la máxima respuesta proliferativa contra nervio ciático correspondió a una incorporación de 10.592 ± 314 dpm (Figura 9B).

TABLA 4: CONCENTRACION DE MITOMICINA C INHIBITORIA DE LA PROLIFERACION DE CELULAS ESPLENICAS TOTALES

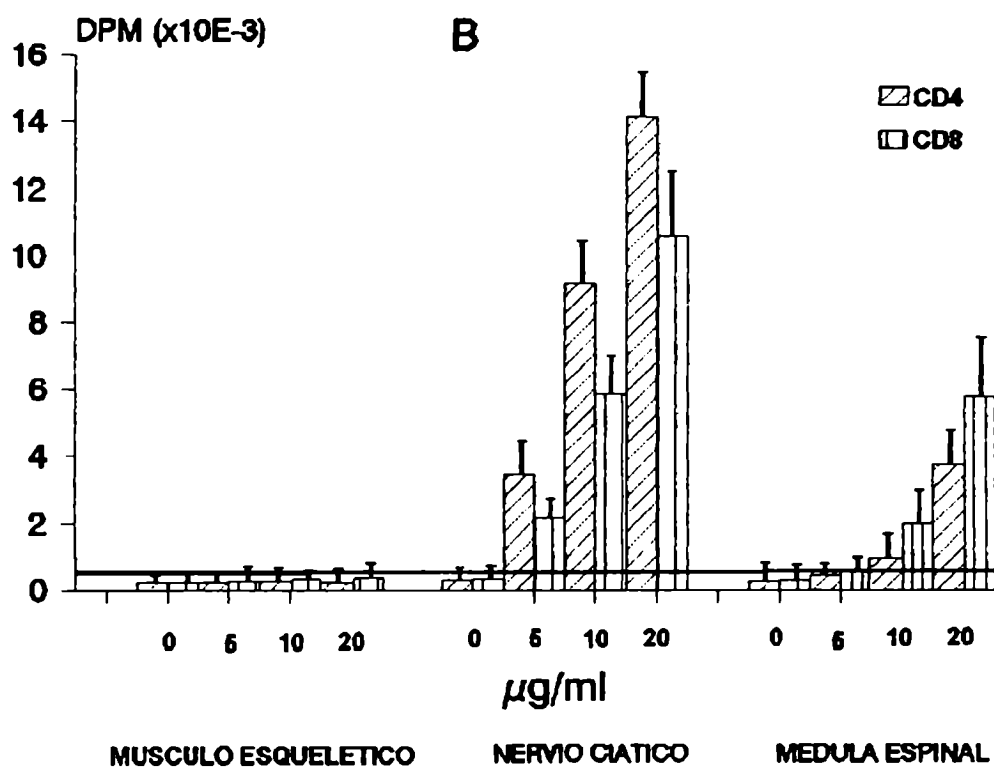
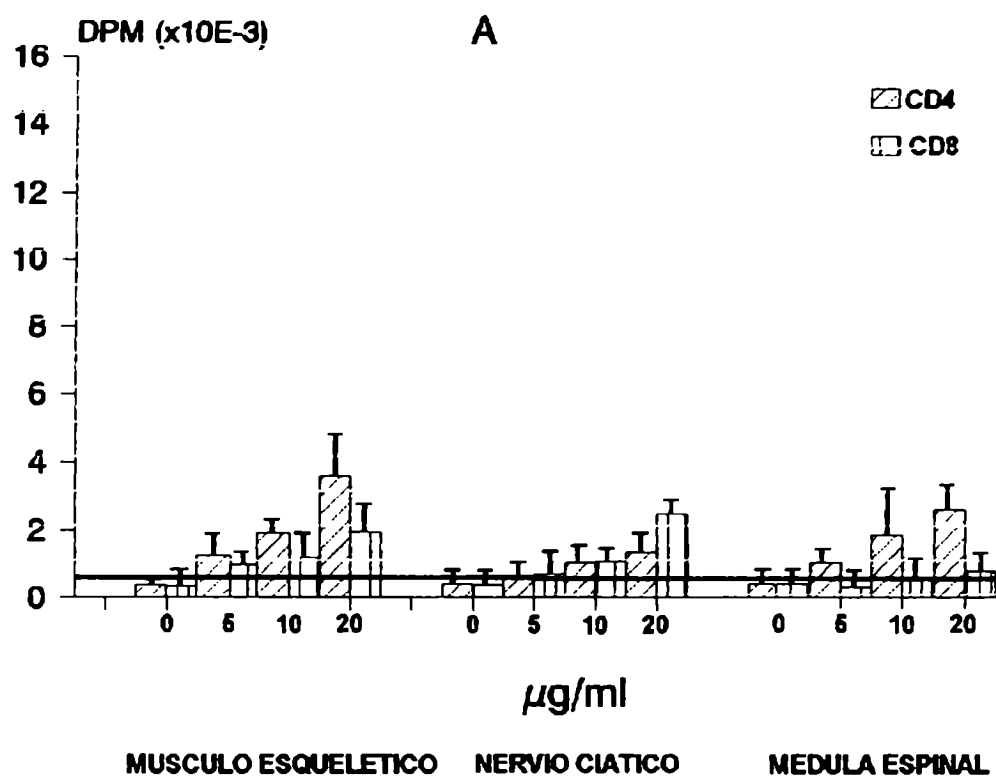
MITOMICINA C ($\mu\text{g/ml}$)	DPM (MEDIA \pm DE) ¹
0	124.783 \pm 8.324
10	19.433 \pm 1.226
20	2.342 \pm 157
40	422 \pm 17
60	419 \pm 22
80	416 \pm 31

Uno $\times 10^5$ células no tratadas (control) o tratadas con las dosis de mitomicina C indicadas se incubaron en presencia de concanavalina A (5 $\mu\text{g/ml}$) en las condiciones indicadas en Materiales y Métodos.

¹ Se realizaron dos ensayos por triplicado.

Figura 9: Respuesta proliferativa de linfocitos T CD4 y CD8 de ratones infectados con K-98 (A) y RA (B), frente a Ag de músculo esquelético, nervio ciático y médula espinal. La línea horizontal representa la media \pm 1 desviación estándar de la incorporación de ^3H -timidina por células normales.

FIGURA 9: PROLIFERACION DE LINFOCITOS T



II.D. LA PROLIFERACION DE LOS LINFOCITOS T FRENTE A AG PROPIOS OCURRE COMO CONSECUENCIA DE LA INFECCION

Las subpoblaciones CD4 y CD8 de ratones normales mostraron niveles de incorporación de ^3H -TdR frente a los Ag estudiados, similares a los observados en condiciones basales (incorporación de ^3H -TdR en ausencia Ag, 432 ± 154 dpm) (Figuras 9A y 9B), lo que confirma que:

1. Las preparaciones antigénicas carecen de actividad mitogénica inespecífica.
2. La proliferación de los linfocitos frente a los tejidos se desencadena como consecuencia de la infección.

Los resultados de proliferación señalaban que la infección abrogaba la tolerancia de las subpoblaciones de linfocitos T frente a Ag propios. Para establecer si este hallazgo *in vitro* tenía algún significado fisiopatológico, se decidió realizar estudios de transferencia pasiva de linfocitos CD4 y CD8 de dadores infectados con RA y K-98 a ratones singeneicos normales.

Dado que junto con las células transferidas podrían pasar pequeñas cantidades de parásitos, previamente se estudió el curso de la infección con bajas dosis de TS del clon K-98 y de la cepa RA.

III. DOSIS MINIMA DE PARASITOS RESPONSABLE DE LA PRODUCCION DE LESIONES

Como paso previo a la realización de los estudios de transferencia pasiva, y con el fin de determinar qué parámetros o características de las lesiones permitirían descartar que las mismas hubieran sido producidas por una eventual infección debida a mínimas cantidades de parásitos contaminantes de las preparaciones de linfocitos, se realizó un estudio parasitológico, histopatológico y serológico en ratones infectados con dosis crecientes del clon K-98 y de la cepa RA.

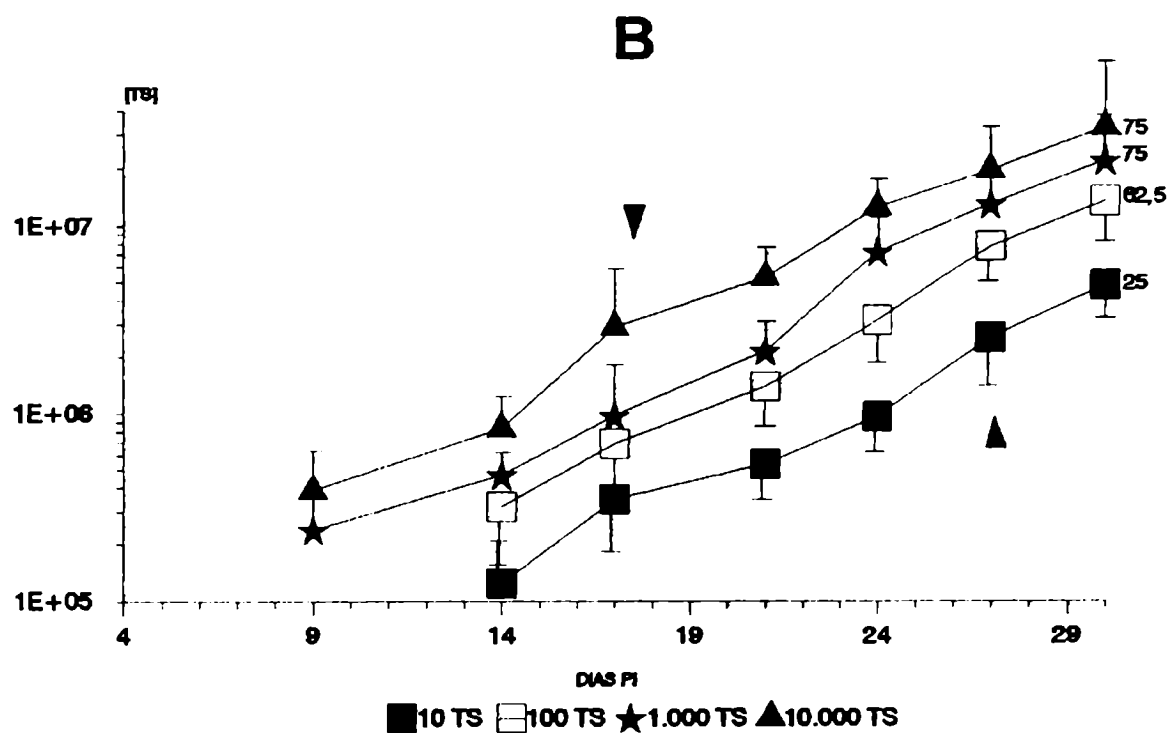
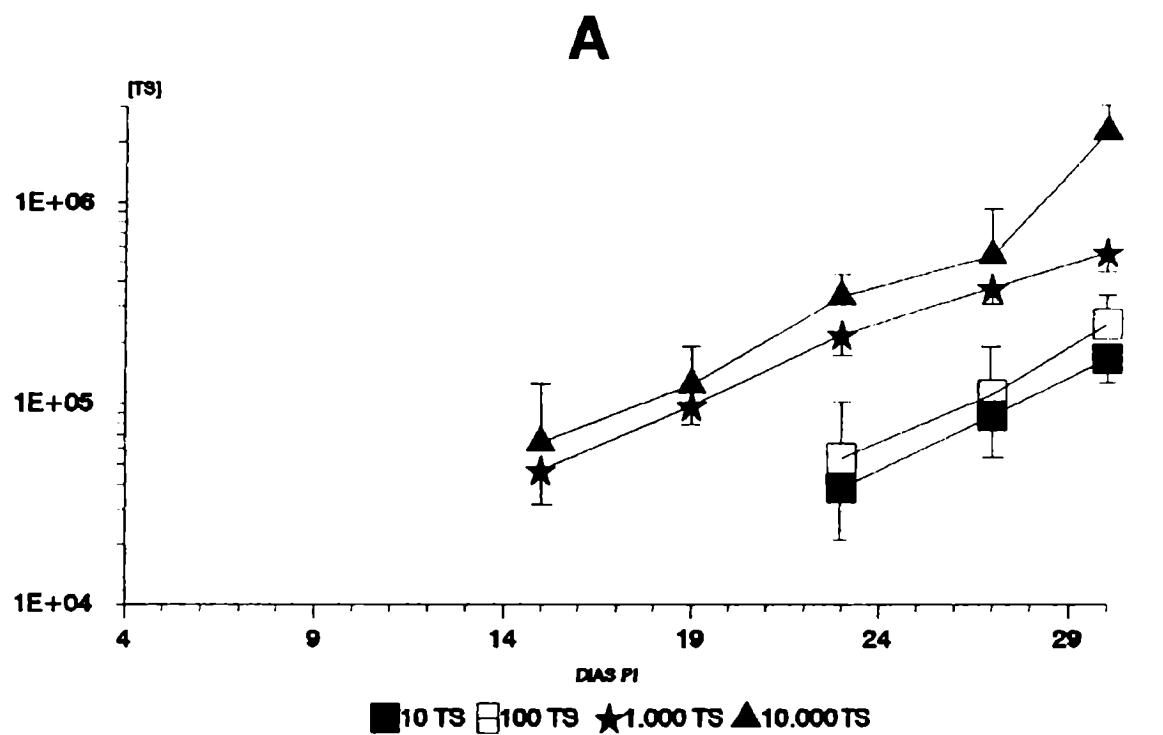
Se seleccionaron tiempos de estudio que abarcaron los elegidos para los estudios de transferencia, con el objeto de poder comparar ambos resultados.

III.A. PARASITEMIA

Aún con el menor inóculo (10 parásitos), los ratones infectados desarrollaron parasitemia detectable, en el 40-60% de los animales cuando se inoculó K-98 y en el 100% cuando la cepa infectante fue RA. En el caso del clon K-98 la detección de parasitemia mediante microhematocrito

Figura 10: Evolución de la parasitemia durante la fase aguda en ratones C3H/HeN infectados por vía iv con 10 TS del clon K-98 de T.cruzi (A) y de la cepa RA (B). Las flechas indican el momento en que comienzan a morir los animales en los grupos de mayor y menor inóculo. Los números indican los porcentajes de mortalidad al final del período de observación.

**FIGURA 10: PARASITEMIA DE RATONES C3H/HeN
EN FUNCION DE LA DOSIS INFECTANTE**



fue posible a partir de los 6 y 9 días pi, y mediante hemocitómetro a partir de los 15 y 23 días pi cuando se inocularon dosis altas y bajas, respectivamente. En infecciones con la cepa RA la parasitemia fue detectable mediante MHT a los 4 días pi, con las dosis altas de parásitos (1000 y 10000 tripomastigotes/ratón), y a los 7 días pi con las dosis bajas (10 y 100 tripomastigotes/ratón). El recuento mediante hemocitómetro pudo efectuarse a partir de los 9 y 14 días pi, respectivamente, en ratones infectados con dosis altas y bajas de esta cepa. En las figuras 10A y 10B se muestran las parasitemias de los grupos experimentales inoculados con las distintas dosis de parásitos del clon K-98 y de la cepa RA, respectivamente.

III.B. SEROLOGIA

Todos los ratones parasitológicamente positivos presentaron títulos de Ac por encima del valor de corte de las técnicas serológicas utilizadas (1:16 para IFI y 1:32 para AD), observándose un incremento del título con el curso de la infección en los tiempos estudiados. En la Tabla 5 se resumen los resultados de los estudios serológicos de los ratones inoculados con la menor dosis (10 TS).

III.C. HISTOPATOLOGÍA

En los ratones infectados con las dosis mayores del clon K-98 (1×10^3 y 1×10^4 tripomastigotes), se observaron lesiones inflamatorias focales en músculo esquelético desde el día 12 pi y en tejido nervioso desde el día 15 pi. Con dosis menores el cuadro histológico fue similar pero más tardío (En la Tabla 6 se registran los datos de ratones inoculados con 10 TS). En el músculo esquelético de estos animales se detectaron parásitos (Ag) asociados a los focos inflamatorios (Tabla 6). Por otra parte, en el caso de la cepa RA, los ratones inoculados con la menor dosis (10 tripomastigotes), evidenciaron infiltrados inflamatorios focales perivasculares e intersticiales en músculo isquiotibial, epineurales en nervio ciático y meníngeos en médula espinal, los que fueron evidentes a partir del día 10 pi (Tabla 6). Con dosis mayores los infiltrados se observaron desde el día 7 pi. En este caso, se observaron parásitos asociados a los focos inflamatorios tanto en músculo como en nervio.

En base a estos resultados, sabíamos que pequeños inóculos de parásitos de ambas cepas podían ser detectados mediante el empleo conjunto de técnicas parasitológicas convencionales y estudios serológicos. Para mayor seguridad se decidió incorporar controles de co-infección en cada ensayo de transferencia pasiva de linfocitos T, a fin de descartar que la presencia de parásitos viables en las suspensiones de linfocitos T fueran responsables de la patología observada en los receptores singéneos, así como investigar la presencia de ADN de T.cruzi en dichos receptores (ver Sección IV.C.1.b).

TABLA 5: DETECCION DE Ig EN RATONES INFECTADOS CON 10 TS (RA Y K-98)

DIA PI	CEPA DE T.CRUZI			
	RA		K-98	
	IFI (16) ¹	AD (32)	IFI (16)	AD (32)
7	16 ²	32 ³	16	32
10	16	64	16	32
14	64	512	32	128
19	256	1024	32	512
24	1024	2048	128	512
30	>1024	>4096	512	1024

¹ Técnica (Valor de corte): IFI, inmunofluorescencia indirecta; AD, aglutinación directa en ausencia de 2-ME.

²Título de IgG (título más bajo observado).

³Título de Ig totales (título más bajo observado).

TABLA 6: PROGRESION DE LAS LESIONES INFLAMATORIAS EN RATONES INFECTADOS CON 10 TS DE T.CRUZI

DIA PI	CEPA DE <u>T.cruzi</u>			
	K-98		RA	
	SN ¹	ME	SN	ME
4	-	-	-	-
7	-	-	-	-
10	-	-	ep Ag	+ ² Ag
12	-	-	ep Ag	+ Ag
15		+ Ag	ep Ag	+ Ag
18	ep	+ Ag	ep/per Ag	+ Ag
21	ep	+ Ag	ep/per Ag	+ Ag
25	ep	++ Ag	ep/per/en ³ Ag	+ Ag
27	ep/per	+++ Ag	ep/per/en Ag	++ Ag
30	ep/per	+++ Ag	ep/per/en Ag	++ Ag

¹SN, sistema nervioso; ME, músculo esquelético.

²+, infiltrados focales dispersos; ++, infiltrados nodulares no coalescentes; +++, infiltrados nodulares coalescentes.

³ep, epineurial; per, perineurial; en, endoneurial; Ag, presencia de antígeno de T.cruzi.

IV. ESTUDIOS DE TRANSFERENCIA PASIVA

Si bien existían rasgos comunes en las características histopatológicas de las lesiones producidas por la infección con las cepas RA y CA-I, las diferencias cualicuantitativas en la composición celular de los infiltrados -observadas en los estudios inmunohistoquímicos- y las diferencias en el reconocimiento antigénico -evidenciados en los estudios de proliferación de las subpoblaciones de linfocitos T- indicaban que los mecanismos patogénicos involucrados podían ser diferentes. Además, los resultados de proliferación sugerían que diferentes Ag tisulares eran reconocidos por los linfocitos T CD4 y CD8 de los ratones infectados por RA y por el clon K-98. Dado que existen evidencias experimentales sobre el papel que el sistema inmune (en particular los linfocitos T) tiene en la producción de lesiones en la fase crónica, se decidió estudiar la responsabilidad de las subpoblaciones T en la producción de lesiones en este modelo experimental.

IV.A. TRANSFERENCIA DE LINFOCITOS DE RATONES INFECTADOS CON EL CLON K98

La transferencia de linfocitos T CD4 indujo la formación de infiltrados inflamatorios localizados exclusivamente en músculo esquelético.

IV.A.1. *LINFOCITOS T CD4*

IV.A.1.a. Histopatología: En músculo esquelético se hallaron infiltrados inflamatorios mononucleares focales observables 7 días después de realizada la transferencia. A los 15 días los infiltrados eran moderados/intensos perivasculares e intersticiales (Figura 11A) y existían signos de necrosis miofibrilar (Figura 11B). Por otra parte, en sistema nervioso no se observaron lesiones inflamatorias o degenerativas, por lo que los estudios inmunohistoquímicos se limitaron a músculo esquelético.

IV.A.1.b. Inmunohistoquímica: La composición fenotípica de los infiltrados se detalla en la Tabla 7. Se observó que el mayor número de células marcadas correspondía al fenotipo de linfocitos T cooperadores (CD4+; $72,1 \pm 16,3\%$, Figura 12).

Figura 11: Infiltrados intersticiales (A) y necrosis miofibrilar (A y B) en un ratón C3H/HeN, 15 días después de ser transferido por vía iv con 1×10^7 linfocitos T CD4 de un dador singeneico infectado crónicamente con CA-I . (H&E, 250x).

**FIGURA 11: TRANSFERENCIA PASIVA DE
LINFOCITOS T CD4 (DADORES INFECTADOS CON
K-98): HISTOPATOLOGIA**

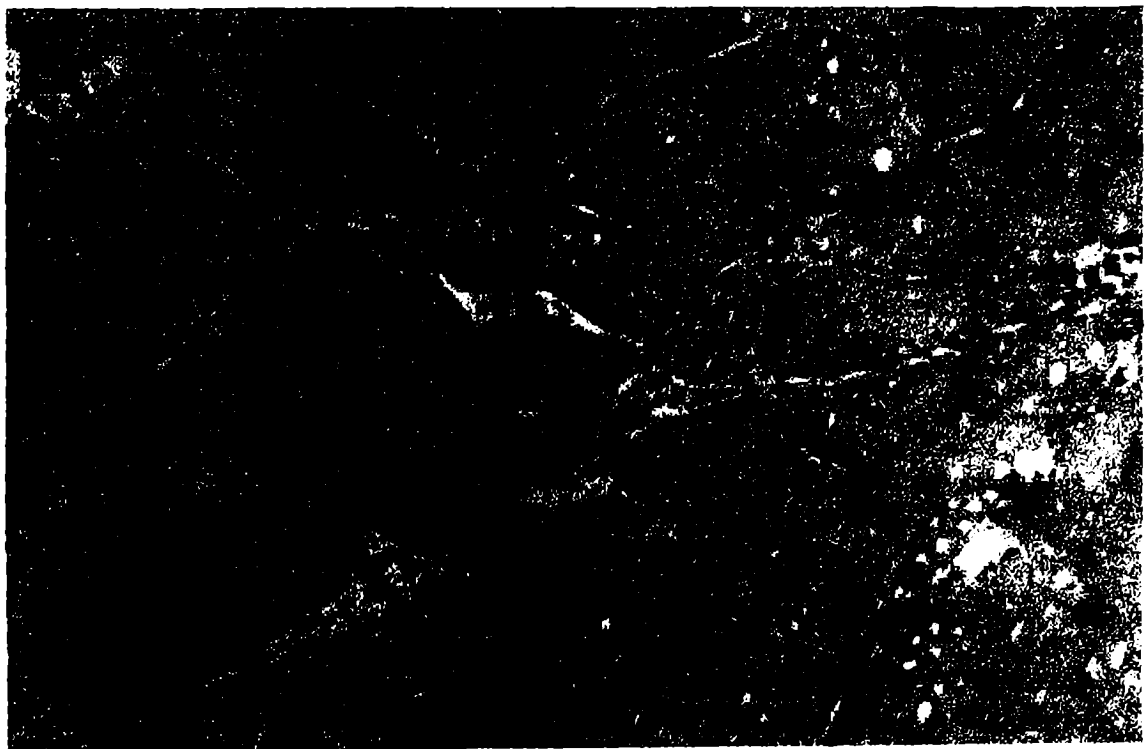
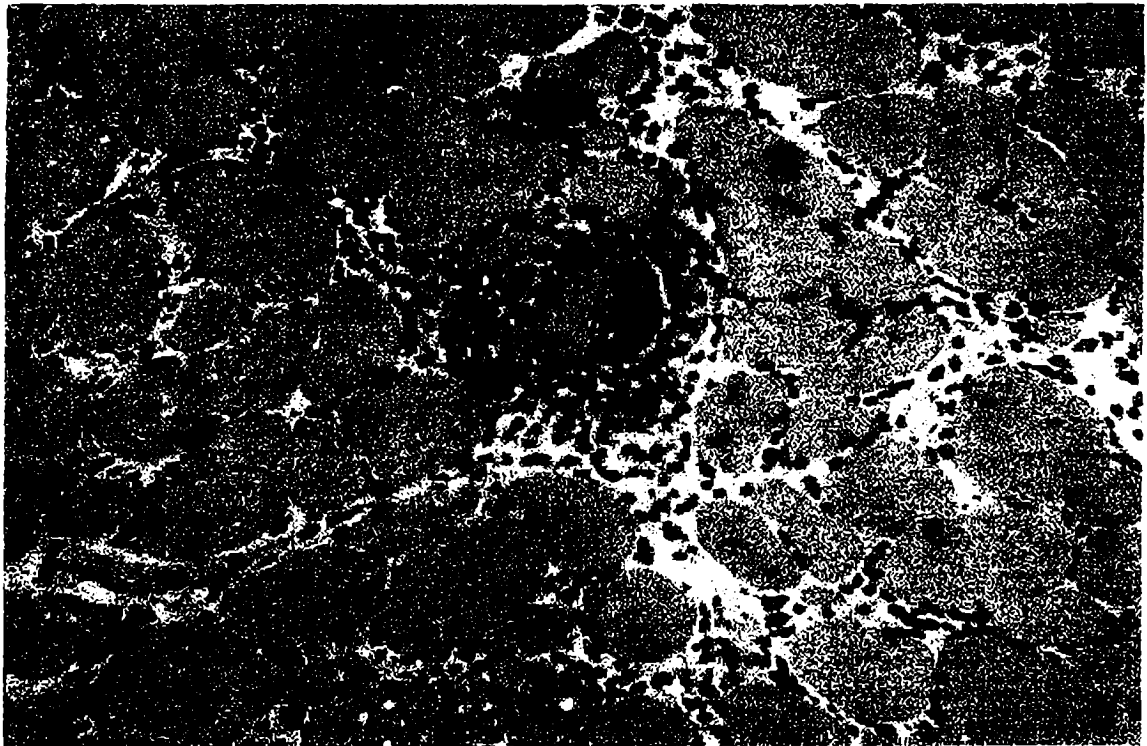
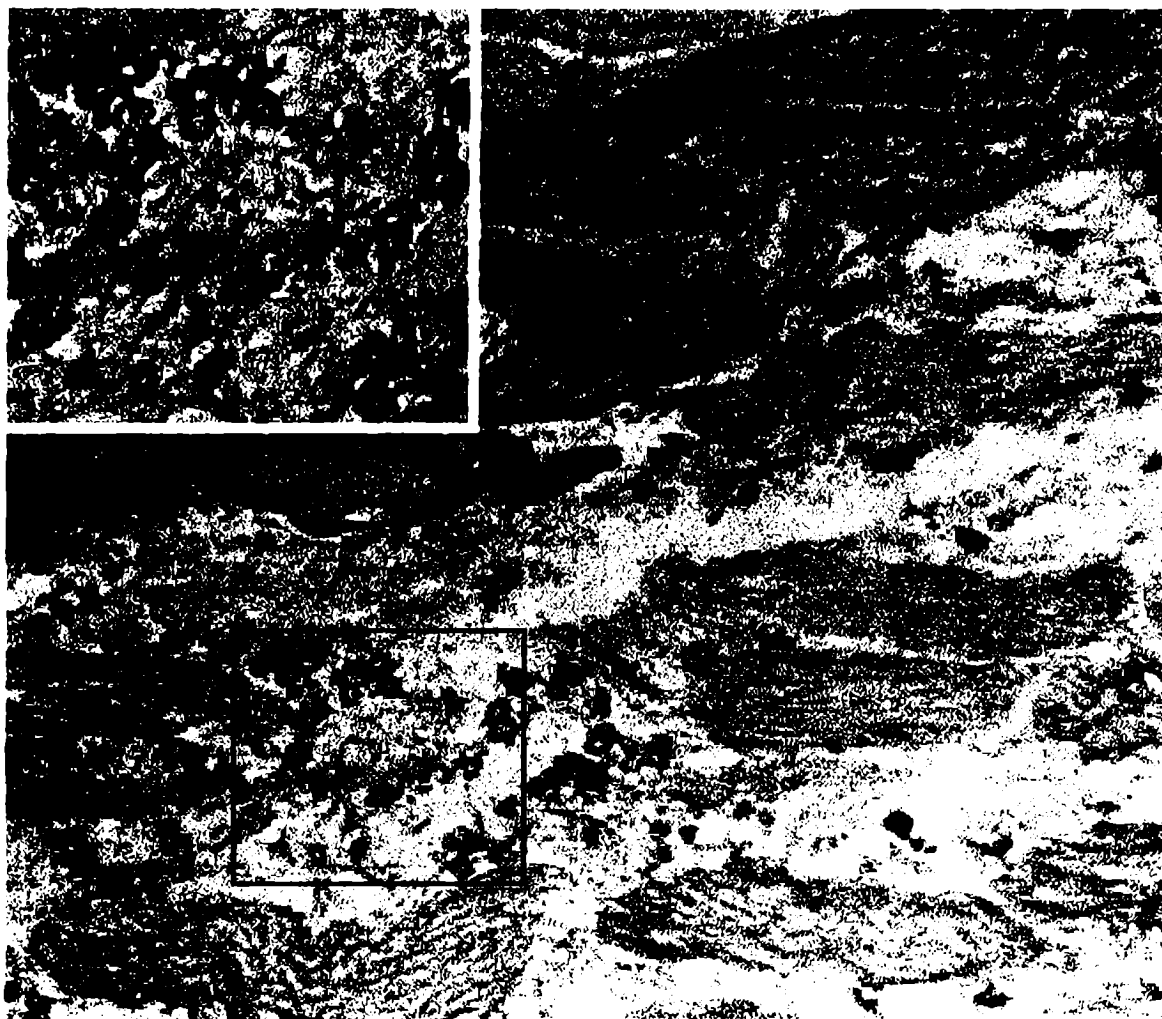


Figura 12: Linfocitos T CD4 en el músculo esquelético de un ratón C3H/HeN, 15 días después de recibir 1×10^7 linfocitos T del mismo fenotipo obtenidos de un dador singeneico infectado con CA-I (120 días pi). BAP/eosina, 250x. El inserto muestra un detalle de la misma sección (400x).

**FIGURA 12: TRANSFERENCIA PASIVA DE
LINFOCITOS T CD4 ((DADORES INFECTADOS
CON K-98): INMUNOHISTOQUIMICA**



IV.A.2. *LINFOCITOS T CD8*

Esta población celular no indujo el desarrollo de patología detectable por técnicas histológicas.

IV.A.2.a. Histopatología: En los tejidos estudiados no se observaron cambios histopatológicos (presencia de infiltrados o alteraciones de la histoarquitectura), tanto a los 4 como a los 7 días post-transferencia. En razón de lo expuesto, no se realizaron estudios inmunohistoquímicos.

IV.B. TRANSFERENCIA DE LINFOCITOS DE RATONES INFECTADOS CON LA CEPA RA

A diferencia de lo observado con el clon K-98, ambas subpoblaciones de linfocitos T indujeron lesiones localizadas en tejido nervioso.

IV.B.1. *LINFOCITOS T CD4*

IV.B.1.a. Histopatología: Las lesiones en nervio ciático consistieron en infiltrados inflamatorios mononucleares focales evidentes a los 7 días post-transferencia. A los 15 días, las manifestaciones inflamatorias tuvieron un desarrollo moderado o intenso dependiendo del animal estudiado. La localización predominante fue epineurial (Figura 13A) y en algunos animales se observaron focos inflamatorios periendoneurales y abundantes cámaras de digestión de mielina. En médula espinal se hallaron infiltrados mononucleares localizados en la leptomeninges en algunos de los ratones estudiados (Figura 13B). Los escasos infiltrados observados en músculo esquelético tenían una distribución limitada a las terminaciones nerviosas intramusculares, manteniéndose intacto el endomisio (Figura 13C).

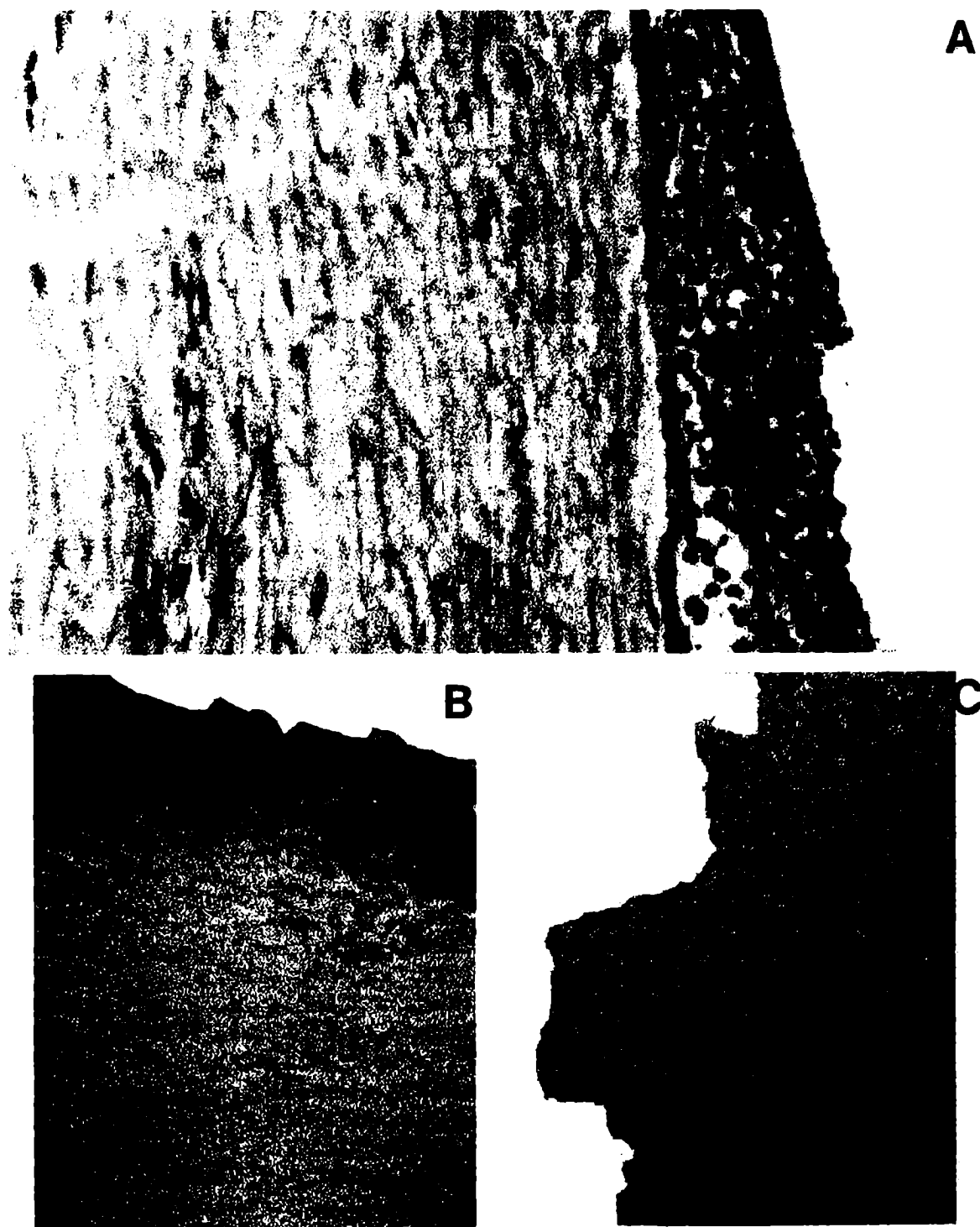
IV.B.1.b. Inmunohistoquímica: Los linfocitos T cooperadores (CD4+) representaron la población mayoritaria de células en los infiltrados inflamatorios en nervio ($57,3 \pm 9.4\%$), en tanto que en médula la población mayoritaria estaba representada por macrófagos (CD11b+; $56,3 \pm 8.9\%$). En nervio ciático se observó que cerca del 3% de las células del infiltrado no eran marcadas con los anticuerpos utilizados en este estudio (Tabla 7).

Figura 13A: Infiltrado epineurial en un ratón C3H/HeN, 15 días después de la transferencia de 1×10^7 linfocitos T CD4 de dadores singeneicos infectados con RA (120 días pi). H&E, 400x.

Figura 13B: Intensa leptomeningitis en un ratón C3H/HeN, 15 días después de ser transferido con 1×10^7 linfocitos T CD4 de dadores singenicos infectados con RA (120 días pi). H&E, 200x.

Figura 13C: Ratón C3H/HeN 15 días después de la transferencia de 1×10^7 linfocitos T CD4 de dadores singeneicos infectados con RA (120 días pi). Nótese la presencia de células inflamatorias en epineuro, perineuro y endoneuro de una fibra nerviosa intramuscular y su ausencia en el endomisio. H&E, 100x.

**FIGURA 13: TRANSFERENCIA PASIVA DE
LINFOCITOS CD4 (DADORES INFECTADOS CON
RA, 120 DPI): HISTOPATOLOGIA**



IV.B.2. *LINFOCITOS T CD8*

Esta subpoblación indujo la formación de infiltrados inflamatorios en tejido nervioso, con localización similar a la observada en la transferencia de CD4, aunque con mayor precocidad.

IV.B.2.a. Histopatología: Los ratones que recibieron linfocitos T CD8 de dadores infectados con RA manifestaron compromiso del sistema nervioso. Este estaba representado por infiltrados perineurales y en menor proporción endoneurales en nervio ciático, así como infiltrados en la leptomeninges de médula espinal. Al igual que luego de la transferencia de linfocitos T CD4, en los pocos casos en que se hallaron infiltrados en músculo esquelético, éstos se distribuían casi exclusivamente alrededor de las terminales nerviosas intramusculares, sin comprometer el endomisio. Los infiltrados perineurales a los 4 días pt tenían características focales y a los 7 días pt se observaron infiltrados periendoneurales moderados.

IV.B.2.b. Inmunohistoquímica: La proporción de células CD4+, CD8+ y CD11b+ no mostró diferencias significativas al comparar nervio ciático y médula espinal entre sí, en tanto que la proporción de linfocitos T CD8 en las lesiones fue mayor que la observada tras la transferencia de linfocitos T CD4 (Tabla 7, Figura 14). Por otra parte, las células doble negativas (CD4⁻CD8⁻) alcanzaron valores de alrededor del 8% y 12% en nervio y médula, respectivamente, significativamente mayores que los observados al transferir linfocitos T CD4. Los resultados señalados en esta Sección se resumen en la Tabla 7.

IV.C. CONTROLES DE CO-INFECCION ACCIDENTAL EN LOS RECEPTORES DE LINFOCITOS

Como se señaló en la Sección III, con el fin de descartar que pequeñas cantidades de parásitos presentes en las suspensiones de linfocitos purificados fueran responsables de la producción de las lesiones observadas, se realizaron estudios parasitológicos y serológicos en los ratones receptores y en controles lactantes.

IV.C.1. *ESTUDIOS PARASITOLÓGICOS*

IV.C.1.a. Convencionales: No se observaron parásitos ni por MHT ni mediante técnicas inmunohistoquímicas realizadas tanto en los ratones receptores de 21-25 días como en los lactantes

TABLA 7: COMPOSICION FENOTIPICA DE LOS INFILTRADOS EN TEJIDOS DE RECEPTORES DE LINFOCITOS T

DADORES ¹		RECEPTORES ²		
CEPA	FENOTIPO CELULAR	MUSCULO	NERVIO	MEDULA
K-98	CD4	CD4:72,1±16,3 ³ CD8:5,1±1,3 CD11b:23,0±7,0	NH ⁴	NH
			NH	NH
RA	CD4	NH	CD4:57,3±9,4 ³ CD8:10,4±2,2 DN:2,8±0,4 CD11b:29,8±3,7	CD4:39,2±6,1 CD8:8,4±2,0 DN:0,0 CD11b:56,3±8,9
	CD8	NH	CD4:39,6±10,3 CD8:21,9±9,3 DN:8,4±0,3 CD11b:31,8±8,4	CD4:39,1±6,3 CD8:17,4±3,2 DN:12,7±1,4 CD11b:32,3±6,0

¹Los dadores de linfocitos se infectaron con las dosis de T.cruzi indicadas en Materiales y métodos. En cada transferencia pasiva se inocularon 10x10⁶ linfocitos del fenotipo indicado por vía iv en receptores singeneicos normales.

²Estudiados 7 y 15 días después de la transferencia de linfocitos T CD8 y CD4, respectivamente.

³Porcentaje obtenido mediante análisis de 1000 células. Media±DE de dos ensayos con 5-7 réplicas cada uno.

⁴NH, no hecho.

Figura 14: Linfocitos CD8 en perineuro de un ratón C3H/HeN 7 días después de la transferencia de 1×10^7 células del mismo fenotipo obtenidas de donadores singéneos infectados con RA (120 días pi). BAP/eosina, 400x.

**FIGURA 14: TRANSFERENCIA PASIVA DE
LINFOCITOS T CD8 ((DADORES INFECTADOS
CON RA): INMUNOHISTOQUIMICA**



de diez días de edad inoculados con una alícuota de células T de los dadores infectados. Los ratones lactantes se mantuvieron parasitológicamente negativos en un seguimiento de 30 días.

IV.C.1.b. PCR: Con el fin de certificar la ausencia de parásitos en los receptores que habían resultado negativos por las técnicas parasitológicas convencionales indicadas en el apartado anterior, y en las técnicas serológicas (*vide infra*), se analizaron por PCR los tejidos (bazo, músculo, nervio ciático y médula espinal) de estos animales.

En ninguno de los homogenatos, preparados con los tejidos obtenidos de receptores de linfocitos T de ratones infectados, se pudo demostrar la presencia de ADN de T.cruzi empleando los iniciadores TCZ1 y TCZ2. Por el contrario, los controles positivos (sangre, bazo y tejido muscular y nervioso de ratones infectados) mostraron las bandas de ADN características de T.cruzi en los geles de poliacrilamida luego de la amplificación (Figura 15). Estos resultados confirman la ausencia de infección en los receptores de linfocitos T de dadores infectados, y refuerzan los resultados obtenidos con los estudios parasitológicos convencionales y serológicos (*vide infra*) en los receptores y controles lactantes.

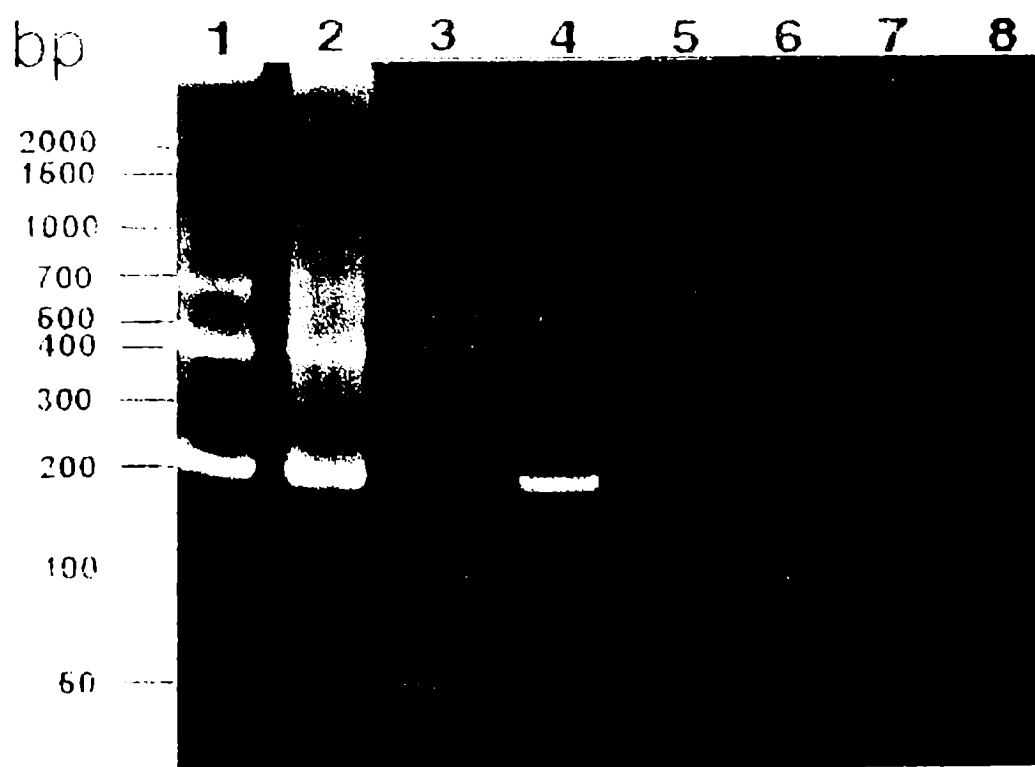
IV.C.2. ESTUDIOS SEROLOGICOS

Los resultados de las IFI y AD realizados en los controles de co-infección lactantes al cabo de 30 días de seguimiento fueron negativos para IgM e IgG. Del mismo modo, la serología de los receptores experimentales fue negativa al momento de efectuar las autopsias para llevar a cabo los estudios histológicos e inmunohistoquímicos con el fin de caracterizar las lesiones neuromusculares inducidas por las subpoblaciones de linfocitos T.

Los resultados obtenidos por medio de los controles parasitológicos convencionales, PCR y serología confirman que las lesiones observadas en los ratones receptores de subpoblaciones de linfocitos T son consecuencia de la transferencia de dichas células y no de la presencia inadvertida de parásitos.

Figura 15: Electroforesis en gel de poliacrilamida de los productos de amplificación por PCR del ADN obtenido de sangre (calles 1 y 2) y tejidos (calle 4) de ratones infectados empleados como controles positivos y de los tejidos de receptores de linfocitos T CD4 (calles 5 y 7, dadores infectados con K-98 y RA, respectivamente) y linfocitos T CD8 (calles 6 y 8, dadores infectados con K-98 y RA, respectivamente). La calle 3 corresponde a los estándares de tamaño de ADN (en pares de bases).

**FIGURA 15: PCR DE TEJIDOS DE RATONES
RECEPTORES DE LINFOCITOS T**



DISCUSION

Las alteraciones funcionales de la unidad motora en la enfermedad de Chagas humana están vinculados a fenómenos neuropáticos y miopáticos primarios que se inician durante la fase aguda (Benavente y col., 1989) y se extienden a la fase crónica (Sanz y col., 1977; Sanz y col., 1978; Sica y col., 1979; Sica y col., 1986). Estas alteraciones involucran músculos esqueléticos (Sanz y col., 1978), neuronas sensoriales (Sica y col., 1986) y motoneuronas a nivel de la médula espinal (Sica y col., 1979).

Ese compromiso electrofisiológico tiene un sustrato histológico caracterizado por lesiones inflamatorias, alteraciones miopáticas (centralización nuclear y el «splitting» de las fibras musculares) y neuropáticas (agrupamiento histoquímico de fibras tipo I y II), observables en la fibra muscular (Taratuto y col., 1978; Sica y col., 1979). Las alteraciones neuropáticas están, así mismo, asociadas a lesiones inflamatorias y desmielinización del trayecto axonal (Sica y col., 1995).

Molina y col. (1987) observaron, durante la fase crónica de la infección de ratones con la cepa Tulahuén, alteraciones compatibles con daño neuropático tanto a nivel muscular (atrofia agrupada) como en nervio periférico (desmielinización) similares a las descritas en esta Tesis durante el período crónico. En los estudios de Molina y col. (1987) si bien mencionan la presencia de nidos de amastigotes en médula espinal, los mismos se hallaban ausentes en nervio ciático. Sin embargo, en estudios posteriores de Molina (1989), el autor comunicó la presencia de amastigotes en tejido epineural. Si bien estos estudios (Molina y col., 1987; Molina, 1989) presentaban a la cepa Tulahuén como un buen candidato para el desarrollo de un modelo comparativo entre cepas para analizar el fenotipo y funcionalidad de las poblaciones linfocitarias, en un estudio comparativo de las alteraciones electromiográficas en diferentes asociaciones línea de ratón/población parasitaria se determinó que la infección de ratones C3H/HeN daba lugar a un patrón neuropático más marcado al ser infectados con la cepa RA (Sanz y col., 1991). Por esta razón los estudios comparativos fueron realizados empleando esta cepa de T.cruzi como modelo de inducción de lesiones predominantemente neuropáticas, y la cepa CA-I o el clon K-98 como modelo de lesiones predominantemente miopáticas.

La posibilidad de disponer de un modelo murino que reproduce adecuadamente las alteraciones neuromusculares descritas en los humanos (González Cappa y col., 1987; Sica y col., 1995), es importante porque permite profundizar el conocimiento de los mecanismos involucrados en su desarrollo. El estudio comparativo de estas dos poblaciones de T.cruzi que difieren en tropismo, virulencia e inmunogenicidad permitió establecer que las diferencias observadas en cuanto a la magnitud del compromiso muscular y nervioso son dependientes de la población parasitaria. Por una parte, la miositis y las alteraciones histológicas miopáticas detectadas durante la infección con CA-I fueron marcadamente acentuadas, en tanto las lesio-

nes de tejido nervioso tuvieron menor frecuencia y magnitud. Por el contrario, la presencia de lesiones en tejido nervioso fue una constante en la infección con la cepa RA, observándose no solamente lesiones inflamatorias y degenerativas en nervio ciático sino también un importante compromiso inflamatorio en meninges. Molina y col. (1987) comunicaron el compromiso del sistema nervioso similar al observado con la cepa RA en esta Tesis, en ratones infectados con la cepa Tulahuén, que presenta un tropismo semejante al de la cepa RA. Los autores describen desmielinización y presencia de infiltrados inflamatorios en nervio ciático, aunque con mayor frecuencia en epineurio que en endoneurio, así como meningitis y radiculitis ventral.

La intensidad de los infiltrados inflamatorios y del compromiso nervioso y muscular difirió en los ratones infectados con una u otra población parasitaria, si bien encontramos rasgos comunes entre los cuales la escasa presencia de leucocitos polimorfonucleares en los infiltrados, la progresión de la miositis y la degeneración axonal fueron los más sobresalientes. En relación a la composición celular predominantemente mononuclear, estos resultados concuerdan con estudios previos de nuestro laboratorio (González Cappa y col., 1987; Losavio y col., 1989). Es necesario señalar aquí que Molina y Kierszenbaum (1988) también describieron el predominio de células mononucleares en músculo esquelético y miocardio, durante las fases aguda y crónica de la infección murina con la cepa Tulahuén. En este estudio la presencia de escasos leucocitos polimorfonucleares estaba asociada primordialmente a células necróticas durante la fase aguda. El predominio de células mononucleares durante la fase aguda, en particular linfocitos, también fue señalado por Sun y Tarleton (1993) en un estudio de caracterización del fenotipo de células inflamatorias en músculo esquelético y miocardio en ratones infectados con las cepas Brasil y el clon Sylvio X10/4. Por el contrario, Ben Younes-Chennoufi y col. (1988) han descrito la presencia de un porcentaje elevado de leucocitos polimorfonucleares (alrededor del 50%), tanto durante la fase aguda como crónica de la infección de ratones C3H/HeJ y C57Bl/6 con las cepas CL e Y. Estos resultados sugieren que las diferencias en la composición cualicuantitativa de los infiltrados inflamatorios dependería tanto de las características de la cepa de *T. cruzi* como de la genética del huésped. Dichas diferencias podrían, por otra parte, estar involucradas en el desarrollo de distintas manifestaciones patológicas. Este último aspecto fue investigado por Rowland y col. (1992), quienes demostraron que en ratones endocriados la severidad de las lesiones cardíacas está vinculada a genes no asociados al CMH. De manera similar, Sanz y col. (1991) demostraron en ratones exo- y endocriados (de diferentes haplotipos) infectados con cepas de diferente virulencia y tropismo, que las alteraciones electromiográficas (signos miopáticos o neuropáticos) dependían de la asociación huésped/parásito considerada.

La presencia de las lesiones demostrables histológicamente se correlacionó con los hallazgos electromiográficos que evidenciaron compromiso miopático primario en el caso de la cepa CA-I, aunque en la fase crónica se observó un patrón mixto con componentes miopáticos y neuropáticos. Esto podría estar relacionado con la elevada intensidad del proceso inflamatorio,

que terminaría comprometiendo las terminales nerviosas intramusculares y los axones durante el curso de la infección. En un estudio previo González Cappa y col. (1987) comunicaron resultados similares durante el período crónico de la infección de ratones Rockland con la misma población parasitaria.

Por el contrario, durante la fase aguda de la infección con la cepa RA, los ratones exhibieron alteraciones neuropáticas primarias que se correlacionaron con la mayor intensidad de las lesiones observadas en el nervio ciático, en comparación con lo observado en ratones infectados con la cepa CA-I. La tendencia a un mayor compromiso inflamatorio del tejido nervioso, persistente durante el curso crónico de la infección con RA, puede en principio asociarse a la invasión parasitaria del tejido epineural y, probablemente, de las células de Schwann, ya que observamos nidos de amastigotes en endoneurio.

El análisis fenotípico de las poblaciones celulares inflamatorias demostró diferencias notorias. Así, la población celular predominante dependió de la población parasitaria, del tejido afectado y del tiempo post-infección. Una de las características más evidentes, en los ratones infectados con RA, fue el predominio persistente de los linfocitos T CD8 en el tejido nervioso. Si bien estos resultados concuerdan con los de Sun y Tarleton (1993), que demostraron el predominio de linfocitos T CD8 en miocardio y músculo esquelético concurrente con el parasitismo tisular por la cepa Brasil, en los ratones estudiados en esta Tesis la composición fenotípica de los infiltrados no se correlaciona con la intensidad del parasitismo tisular. Observamos que en la asociación C3H/RA el predominio de los linfocitos T CD8 se extendía durante todo el curso de la infección en médula espinal, aún en ausencia de parasitismo evidente en este tejido. Por el contrario, en músculo esquelético, tejido en el cual sí hallamos parásitos de manera persistente, el predominio de este fenotipo estuvo limitado a la fase crónica. En el mismo tejido y en el caso de la cepa CA-I, si bien el parasitismo fue constante, el fenotipo predominante fue CD4⁺, tanto en la fase aguda como en la crónica temprana. Diversos autores han comunicado el predominio de este fenotipo en lesiones inflamatorias de diversos tejidos. Ben Younes-Chenoufi y col. (1988) comunicaron la preeminencia de este fenotipo sobre los linfocitos T CD8 en músculo esquelético y cardíaco, independientemente de la línea de ratón y de la cepa de *T. cruzi*. La presencia de células CD4⁺ en las lesiones estaría relacionada al desencadenamiento y desarrollo de las lesiones inflamatorias, tanto durante la fase aguda (Russo y col., 1988) como durante la crónica (Hontebeyrie-Joskowicz y col., 1987; Ben Younes-Chenoufi, 1988; Ribeiro dos Santos y col., 1992). Las diferencias observadas por los distintos autores y por nuestro grupo podrían estar relacionadas con las distintas características biológicas y bioquímicas de las cepas empleadas, así como con las diferencias genéticas de los ratones empleados en los estudios experimentales citados.

Si bien desde el punto de vista histopatológico las consecuencias de la infección son aparentemente similares, las diferencias en el tropismo parasitario y en la composición

cualicuantitativa de los infiltrados sugirió la posibilidad que mecanismos no asociados a la presencia actual de Ag parasitario estuvieran involucrados en la patogenia de las lesiones neuromusculares durante la fase crónica. Por esta razón, se investigó la validez de la hipótesis de un mecanismo autoinmune como responsable de la patología.

En modelos experimentales de patologías autoinmunes se ha observado que algunos de los mecanismos de tolerancia central (deleción clonal a nivel del timo) o periférica (mecanismos de supresión antígeno-específica) están alterados (Sakaguchi y Sakaguchi, 1990). La manifestación más evidente de estas patologías es la presencia de autoanticuerpos que reconocen Ag propios, como se observa en el lupus eritematoso sistémico (revisado por Naparstek, 1993), en la enfermedad de Graves (revisado por Sinha y col., 1990) y en la miastenia gravis (Lindstrom y col., 1976), o de linfocitos T que proliferan frente antígenos autólogos como se estableció en la encefalomiелitis alérgica experimental (Ben-Nun y Cohen, 1982) -modelo de la esclerosis múltiple (Wisniewsky y Keith, 1977)- y en la artritis autoinmune experimental (Holoshitz y col., 1983).

Dado que en la enfermedad de Chagas experimental se habían descrito fluctuaciones cualicuantitativas en las subpoblaciones de timocitos (Leite de Moraes y col., 1991) que podrían estar involucradas en el desarrollo de autoinmunidad, decidimos analizar la existencia de linfocitos T autorreactivos en nuestro modelo de patología neuromuscular. Los resultados obtenidos demostraron la existencia de linfocitos T autorreactivos en ratones crónicamente infectados con ambas poblaciones de *T.cruzi*. Sin embargo, observamos diferencias en el reconocimiento de los tejidos en relación a la población parasitaria infectante. Los linfocitos T CD4 y CD8 de ratones infectados con el clon K-98 de CA-I reconocieron todos los tejidos, aunque la respuesta de los linfocitos T CD4 frente a músculo esquelético fue la de mayor magnitud. Por el contrario, en el caso de los ratones infectados con la cepa RA la respuesta de ambas subpoblaciones de linfocitos T estuvo dirigida exclusivamente hacia tejido nervioso y la incorporación de ³H-timidina fue aproximadamente tres y seis veces mayor que la observada en el caso de K-98 para médula y nervio, respectivamente. Si bien no se determinó la identidad bioquímica de los Ag frente a los cuales los linfocitos T respondían, las diferencias observadas sugerían que ambas subpoblaciones de linfocitos de ratones infectados con cepas de *T.cruzi* que difieren en comportamiento biológico, reconocían Ag (y probablemente epitopes) diferentes en tejido nervioso y que la autotolerancia frente a tejido muscular no había sido abrogada en la infección por RA.

La sola existencia de linfocitos T autorreactivos no es una indicación del desarrollo de un mecanismo autoinmune, ya que en los individuos normales suelen existir, aunque su frecuencia y la afinidad de sus receptores es baja. La capacidad de los linfocitos T autorreactivos de

desencadenar patología *in vivo* es considerada una evidencia crucial para incluir una patología en la definición de autoinmune (revisado por Rose y Bona, 1993). Por esta razón decidimos llevar a cabo la transferencia pasiva de subpoblaciones de linfocitos T CD4 y CD8 de ratones crónicamente infectados. Dado que la cepa CA-I incluye algunos clones letales que pueden comportarse en algunos aspectos de manera similar a la cepa RA (A.M. Celentano, 1996), decidimos utilizar el clon K-98, con características biológicas semejantes a las observadas en la cepa madre, para realizar los estudios comparativos de patología mediada por poblaciones linfocitarias. Por el contrario, la cepa RA muestra variaciones en su virulencia sólo excepcionalmente (A.M. Celentano, comunicación personal), por lo que en dichos experimentos se empleó la población no clonada.

Antes de realizar los experimentos de transferencia pasiva investigamos las características de las lesiones desencadenadas con dosis crecientes de tripomastigotes ya que, independientemente de los controles de co-infección en ratones lactantes incorporados en cada grupo experimental de transferencia, se deseaba determinar la sensibilidad de las técnicas parasitológicas y serológicas convencionales para detectar lesiones asociadas a la infección con bajas dosis de parásitos en los animales receptores.

Se decidió realizar este estudio en razón de que Mortatti y col. (1992) habían comunicado que la inoculación de dosis bajas de la cepa Y (similar a la cepa RA) resultaba en asociación entre la presencia de parásitos tisulares e infiltrados inflamatorios durante la fase aguda. En esta Tesis encontramos la misma asociación, aunque verificamos que la cinética de la parasitemia y de la aparición de las lesiones tisulares desencadenadas con dosis bajas de parásitos diferían en relación con la población parasitaria. A pesar de esto, la positivización serológica junto al seguimiento parasitológico convencional constituyen controles altamente sensibles para detectar infecciones con inóculos pequeños, como queda evidenciado en esta Tesis.

Sin embargo, dado que los estudios histológicos en los receptores se llevarían a cabo a partir de tiempos más tempranos que aquellos en los que se podía detectar la infección con 100% de sensibilidad en ratones de destete, se decidió emplear -además de los estudios serológicos e inmunohistoquímicos- la inoculación de una muestra de la suspensión celular en ratones lactantes como controles internos en cada experimento. En estos ratones era de esperar la aparición más precoz de los signos de infección si las muestras hubieran estado contaminadas con parásitos. Para reforzar los resultados obtenidos mediante los estudios convencionales, también se realizó PCR en los tejidos de los ratones receptores de linfocitos T para determinar la eventual infección de los mismos.

Mediante ninguno de estos métodos se pudo verificar la infección accidental de los receptores singéneos, por lo que toda manifestación patológica se asumió como inducida por las subpoblaciones de linfocitos T transferidas.

Si bien los linfocitos T de ratones infectados con ambas cepas fueron capaces de inducir patología en receptores singeneicos normales, observamos diferencias en cuanto al fenotipo celular responsable de la inducción de daño y al tejido blanco de la injuria.

Los linfocitos T CD4, pero no los CD8 de ratones infectados con K-98, desencadenaron patología en músculo esquelético y no en tejido nervioso. La responsabilidad de este fenotipo celular en la inducción de patología en modelos experimentales de la enfermedad de Chagas fue descripta por Hontebeyrie-Joskowicz y col. (1987). Sin embargo, los autores sólo refirieron la existencia de lesiones granulomatosas en el hígado (sin indicar en cuantos receptores) y de infiltrados neurales en uno de cuatro ratones receptores. Además, los autores reconocen que controles irradiados inoculados con esas células desarrollaron parasitemia, por lo que no puede descartarse que las lesiones observadas pudiesen estar vinculadas con la presencia de parásitos en los tejidos afectados.

A diferencia de lo observado en la infección por K-98, ambas subpoblaciones de linfocitos T de ratones infectados con RA indujeron lesiones en tejido nervioso. En relación a esta última cepa se observó, además, correlación positiva entre la capacidad de los linfocitos de proliferar frente a Ag de tejido nervioso y la capacidad de producir daño.

Es notable el hecho que los linfocitos T CD8 fueran capaces de mediar patología. La mayor parte de los modelos de transferencia pasiva realizados con subpoblaciones de linfocitos T han demostrado que los linfocitos T CD4 pueden desencadenar patología mediante mecanismos de hipersensibilidad retardada frente a Ag solubles exógenos (Chikunguwo y col., 1993) así como propios (Ben-Nun y Cohen, 1982; Maron y col., 1983; revisado por Cohen y col., 1985). El papel de los autoantígenos en el desarrollo de patología se ha probado en modelos experimentales de esclerosis múltiple (Satoh y col., 1988) y del síndrome de Guillain-Barré (revisado por Hartung y col., 1988) inducidos mediante inoculación de fracciones proteicas de mielina. La hipótesis subyacente en estas patologías es que el agente etiológico induciría a los linfocitos Th1 a producir IFN- γ el que, a su vez, induce la expresión de moléculas de clase II del CMH por parte de las células endoteliales y de Schwann (Wekerle y col., 1986). En este contexto, tanto Ag exógenos como endógenos podrían ser presentados a linfocitos T específicos que participarían en los mecanismos amplificadores y efectores de injuria tisular.

En relación a los linfocitos T CD8 el concepto general es que los mismos están involucrados en los mecanismos de protección frente a patógenos intracelulares, sean estos virus (Lehmann-Grube y col., 1988), bacterias (Kaufmann y col., 1986) o parásitos (Tarleton, 1990; revisado por Sher y Coffman, 1992). Por el contrario, escasa evidencia vincula este fenotipo con la capacidad de producir lesiones tisulares. En modelos de diabetes autoinmune empleando ratones NOD (non-obese diabetic) se ha observado que líneas y clones de linfocitos T CD8 obtenidas de infiltrados pancreáticos son capaces de desencadenar insulitis y diabetes en receptores

singeneicos normales sólo si se co-administran linfocitos T CD4. Estos estudios indicarían que los linfocitos T CD8 intervienen en la destrucción de los islotes β de Langerhans pero que requieren señales derivadas de linfocitos T CD4 para ejercer su función efectora (Nagata y col., 1994).

Los resultados obtenidos en esta Tesis difieren en este sentido. La población de linfocitos T CD8 transferida presentó una contaminación por linfocitos T CD4 de alrededor del 1-2% dependiendo del experimento. En el trabajo citado la relación CD4:CD8 era 4:1 y la poblaciones de linfocitos T CD8 transferidas correspondían a líneas y clones que fueron seleccionados empleando el Ag relevante (islotes β tratados con mitC). En los estudios de transferencia realizados en esta Tesis es poco probable que los linfocitos T CD4 remanentes luego de la selección mediante «panning» fueran suficientes numéricamente para mediar cooperación, ya que debe tenerse en cuenta que ninguna de las poblaciones linfocitarias empleadas era clonada. Esto sugiere que en los experimentos con ratones NOD se transfirieron precursores o células T CD8 en reposo, que requieren de cooperación T para activarse, proliferar y actuar como efectoras. Por el contrario, es probable que en nuestro caso hayamos transferido linfocitos T CD8 activados en los órganos linfoides de los cuales se obtuvieron. Esto concuerda con las observaciones realizadas en esta Tesis en los estudios de proliferación en presencia de rIL-2 y Ag.

Si se piensa en términos de procesamiento y presentación antigénicos los linfocitos T CD8 podrían efectivamente estar involucrados en la patogenia de las enfermedades autoinmunes ya que las células nucleadas presentan autoantígenos en el contexto de moléculas de clase I del CMH. Por otra parte los linfocitos T CD8 activados producen IFN- γ que induce la expresión de moléculas del CMH de clase I en células nucleadas (revisado por Billiau, 1996). Por lo tanto, linfocitos T CD8 sensibilizados frente a Ag propios, en particular de tejido nervioso como resultado de la infección por *T.cruzi*, podrían reconocer las células de tejido nervioso y destruirlas. Esto podría ocurrir aún en ausencia de manifestaciones características del parasitismo tisular, como la expresión de Ag parasitario en la membrana plasmática de las células infectadas (Ribeiro dos Santos y Hudson, 1980; Araujo, 1985). Von Kreuter y Santos-Buch (1986), observaron que en ratones crónicamente infectados con la cepa Brasil (población miotrópica de *T.cruzi*), linfocitos T totales intervenían en la lisis de mioblastos normales si eran previamente estimulados con Ag parasitario, pero no con homogenatos de músculo esquelético de ratones singeneicos. En este estudio, parte del efecto lítico era asignado a una linfoquina presente en los sobrenadantes de cultivo de los linfocitos T. Los resultados presentados en esta Tesis, indican que la subpoblación CD8⁺ de linfocitos T es capaz de proliferar frente a Ag propios y producir neuropatía. Los linfocitos T CD8 activados son capaces de producir y secretar granzima A y perforina, proteínas involucradas en la citólisis (Podack y col., 1988). D'Avila Reis y col. (1993b) demostraron la presencia de infiltrados inflamatorios compuestos

en su mayoría por linfocitos cuyo fenotipo es CD8⁺/CD45RO/granzima A⁺ en el miocardio de pacientes chagásicos crónicos, si bien no realizaron estudios funcionales vinculados con el reconocimiento de Ag de T.cruzi o autoAg por parte de dichos linfocitos. La granzima A es una serina-esterasa presente en linfocitos citotóxicos activados (revisado por Jenne y Tschopp, 1988; revisado por Griffiths y Mueller, 1991). En los estudios presentados en esta Tesis se demuestra que los infiltrados en el tejido nervioso de ratones transferidos con linfocitos T CD8⁺, obtenidos de ratones infectados con RA, presentan un alto porcentaje de linfocitos T CD8⁺. Si bien no realizamos experimentos de tráfico linfocitario, es probable que una importante fracción de los linfocitos CD8⁺ presentes en las lesiones esté representada por los linfocitos transferidos. Resultados obtenidos en un modelo ovino de rechazo de aloinjerto (leucocitos alogénicos) (Verhagen y col., 1995), han demostrado que el 86% de los linfocitos CD8⁺ que emergen de los vasos linfáticos eferentes luego de la estimulación local con linfocitos alogeneicos se hallan activados (expresan altos niveles de CD25 y de moléculas de clase II del CMH). Además, la actividad citolítica en esta población eferente (CD44^{high}, L-selectina⁺) se manifestaba a partir del segundo día de estimulación. Si bien en esta Tesis no se efectuaron estudios fenotípicos para determinar la presencia de los marcadores mencionados en las poblaciones de linfocitos T CD8 transferidas, es probable que los linfocitos obtenidos de ganglios linfáticos y bazo de ratones infectados con RA sean efectores que emergen continuamente de los órganos linfoides, en razón de la continua estimulación antigénica. Más aún, el tiempo de aparición de las lesiones concuerda con estudios de cinética de acumulación de células efectoras en modelos de rechazo de aloinjerto (Orosz y col., 1986).

En relación a la especificidad del blanco de daño tisular caben diversas posibilidades que, hasta el momento, no han sido evaluadas en nuestro modelo. Primero, que la lisis celular mediada por los parásitos haya expuesto Ag propios (Ribeiro dos Santos y Hudson, 1981) y revertido la tolerancia periférica. Sin embargo, es difícil bajo este contexto, explicar por qué en el caso de la cepa RA, que invade músculo esquelético al igual que CA-I/K-98, no se observa proliferación de linfocitos T frente a homogenatos de músculo esquelético *in vitro* ni son capaces de promover patología muscular *in vivo*. La explicación plausible para los resultados obtenidos es la existencia de epitopes homólogos (mimetismo molecular) entre Ag de tejido nervioso y de T.cruzi, que podría ser responsable de la reversión de la tolerancia frente a dicho tejido. La existencia de este tipo de epitopes entre T.cruzi y proteínas específicas de tejido nervioso (Van Voorhis y col., 1991) y muscular (Sadigursky y col., 1982) ha sido descrita por diversos autores como uno de los factores que podrían desencadenar la respuesta autoinmunitaria en la enfermedad de Chagas. Sin embargo, en esos estudios sólo se evaluó la reactividad asociada a la respuesta humoral frente a estos epitopes. Recientemente hemos demostrado que sueros de ratones infectados con la cepa RA y el clon K-98 reaccionan de manera preferencial contra Ag de tejido nervioso (Tekiel y col., manuscrito enviado). La absorción de estos sueros con blots

de tripomastigotes circulantes y con homogenatos de epimastigotes no inhibió la reactividad de dichos sueros frente a los tejidos. Si bien nuestros estudios demostrarían de manera indirecta la ausencia de homología entre Ag de los tejidos murinos y las poblaciones parasitarias empleadas en esta Tesis, debe tenerse en cuenta que la observación está vinculada exclusivamente con la identidad de epitopes B, es decir conformacionales. En los trabajos de Sadigurski y col. (1982) y Van Voorhis y col. (1991) tampoco se estableció si los epitopes homólogos reconocidos por los Ac también correspondían a epitopes T, y si tenían una representación indiscriminada en diferentes poblaciones de T.cruzi. Dado que hasta el presente sólo se ha podido reproducir la patología chagásica mediante la transferencia pasiva de linfocitos T, sólo los epitopes homólogos reconocidos por éstos parecerían tener responsabilidad en la inducción de la patología en el modelo murino. En este sentido, Hontebeyrie-Joskowicz y col. (1987), observaron que líneas de linfocitos T específicas para T.cruzi eran capaces de desencadenar reacciones de hipersensibilidad retardada en 40-50% de ratones al ser inoculadas por vía subcutánea junto a Ag de tejido nervioso. Estos resultados sugerirían que existen epitopes de T.cruzi capaces de estimular una respuesta timo-dependiente frente a Ag de tejido nervioso. Recientemente, Felix y col. (1993) demostraron que la inmunización de ratones Balb/c con linfocitos T CD8⁺ fijados, obtenidos de ratones singeneicos inmunizados con vesículas de membranas plasmáticas de T.cruzi, lisaban mioblastos L6E9 en cultivo, sugiriendo la existencia de mimetismo molecular entre receptores T anti-T.cruzi y moléculas del sarcolema. De manera significativa, en esta Tesis se demostró la existencia de linfocitos T CD8 autorreactivos frente a tejido nervioso *in vitro* y capaces de mediar patología *in vivo*, aunque no hemos evaluado si los mismos poseen idiotopes vinculados en regulaciones como las mencionadas.

Otra alternativa para la autorreactividad observada es el desencadenamiento de expansión policlonal T y B (Minoprio y col., 1986a, 1986b).

En nuestro modelo hemos descripto la presencia de autoanticuerpos dirigidos contra proteínas de tejido nervioso central y periférico, músculo cardíaco y esquelético. Significativamente, la principal reactividad (Western-blot) frente a Ag de músculo esquelético y tejido nervioso se observó durante la fase crónica -en particular a los 270 días pi- en ratones infectados con el clon K-98 (Tekiel y col., remitido para su publicación). Esta reactividad coincide con la aparición, en músculo esquelético y tejido nervioso, de linfocitos B con IgM de superficie, que se describe en esta Tesis. Este isotipo de inmunoglobulina es frecuente en las enfermedades autoinmunes mediadas por autoanticuerpos en ratones NZB, especialmente susceptibles a las mismas, siendo la subpoblación de linfocitos B CD5⁺, B220⁺ (anteriormente reconocidos como Ly1B⁺, LyB5⁺) la responsable de su secreción (Revisado por Smith y Steinberg, 1983). Sugerentemente, en estudios realizados antes del inicio de esta Tesis observamos que en los tejidos obtenidos de ratones crónicamente infectados con CA-I estaban presentes células que eran reconocidas por un AcMo anti-Lyt1. Este marcador incorrectamente descripto como

presente exclusivamente en linfocitos T cooperadores (Ledebetter y col., 1980), es actualmente reconocido como un marcador pan-T (Ledbetter y col., 1980, Ledbetter y col., 1981) estructuralmente idéntico a CD5.

En resumen, los resultados presentados en esta Tesis señalan que en ratones infectados por poblaciones parasitarias de T.cruzi de diferente tropismo y capacidad para inducir respuesta inmune específica, se desarrolla una respuesta autoinmunitaria que es mediada por diferentes subpoblaciones de linfocitos T cuyo fenotipo, así como la identidad de los tejidos blanco afectados, depende de la población parasitaria.

CONCLUSIONES

1. El patrón electromiográfico asociado a las lesiones neuromusculares en la infección por T.cruzi depende de las características de la cepa infectante que estaría vinculado con el tropismo tisular parasitario: se observa un patrón primario miopático en la infección con CA-I y primario neuropático en la producida por RA.
2. Las lesiones inflamatorias que se desarrollan durante la infección en los tejidos muscular y nervioso se caracterizan por el predominio de células mononucleares, siendo más severas en músculo esquelético en la infección con CA-I y en tejido nervioso en la infección con RA. El fenotipo de las células inflamatorias depende de la cepa infectante y del tiempo post-infección.
3. Los linfocitos T CD4 y CD8 de ratones infectados proliferan frente a antígenos autólogos del eje neuromuscular periférico. En el caso del clon K-98, se observa proliferación indiscriminada frente a todos los Ag estudiados (músculo esquelético, nervio periférico y médula espinal), en tanto que la proliferación celular está restringida a sistema nervioso en el caso de linfocitos de ratones infectados con RA.
La proliferación es Ag-específica y ocurre como consecuencia de la infección y no de factores mitogénicos contenidos en las preparaciones antigénicas.
4. La identidad de la subpoblación de linfocitos T que induce la patología neuromuscular depende de la población parasitaria infectante. Sólo los linfocitos T CD4 de ratones infectados con K-98 desencadenan patología muscular en receptores singeneicos normales. Por el contrario, ambas subpoblaciones de linfocitos T obtenidas de ratones infectados con RA son capaces de inducir patología exclusivamente en tejido nervioso, siendo las lesiones causadas por los linfocitos CD8 más precoces que las desencadenadas por linfocitos CD4.
5. Estos resultados demuestran que durante la infección crónica con cepas de T.cruzi que difieren en sus características biológicas, son operativos distintos mecanismos inductores de inmunopatología que desencadenan lesiones a nivel neuromuscular en el modelo murino de enfermedad de Chagas.

DIRECCIONES FUTURAS

Los resultados de esta Tesis demuestran que los linfocitos T de ratones infectados con las cepas RA y CA-I (o el clon K-98) de T. cruzi inducen patología mediante distintos mecanismos. Para profundizar en el conocimiento de estos mecanismos se proponen una serie de hipótesis de trabajo a partir de las cuales se desarrollarán diseños experimentales.

Los aspectos que serán investigados incluyen:

1. Existencia de epitopes homólogos entre el parásito y el huésped en la asociación C3H/RA.
2. Activación policlonal en la asociación C3H/K-98.
3. Mecanismos de tráfico linfocitario asociado a la existencia de reconocimiento selectivo de Ag en la infección por ambas cepas.
4. Expresión de moléculas de adhesión y otros marcadores característicos de linfocitos T de memoria.
5. Grado de clonalidad de los receptores de los linfocitos T presentes en las lesiones.
6. Especificidad y aspectos funcionales (*in vitro* e *in vivo*) de los linfocitos T involucrados en el desarrollo de las lesiones, mediante la obtención de líneas y clones.
7. Existencia de redes idiotipo-antiidiotipo como responsables del desarrollo de la patología en cada una de las asociaciones huésped/parásito estudiadas en esta Tesis.



BIBLIOGRAFIA

Abrahamson IA, Dias da Silva W. 1977. Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity against Trypanosoma cruzi. *Parasitology*, 75:317.

Acuto O, Hussey RE Fitzgerald KA, Protentis JP, Mener SC, Schlossman SF, Reinherz EL. 1983. The human T cell receptor: appearance in ontogeny and biochemical relationship of α and β subunits on IL-2 dependent clones and T cell tumors. *Cell*, 34:717-726.

Alcántara FG. 1970. Desnervação dos gânglios cardíacos intramurais e cervicotorácicos na moléstia de Chagas. *Rev. Goiana Med.*, 16:159-177.

Amaral CFS, Tafuri WL, Brener Z. 1975. Frequência do parasitismo encefálico em camundongos experimentalmente inoculados com diferentes cepas de Trypanosoma cruzi. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 9:243-246.

Andrade ZA. 1984. The canine model of Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 79 (Supl.):77-83.

Andrade ZA, Andrade SG. 1979. Patologia. En: Trypanosoma cruzi e doença de Chagas, págs. 199-248. Editado por Brener Z, Andrade ZA. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

Andrade ZA, Andrade SG. 1993. Pathological findings in Chagas' disease. En: Actualizaciones en la enfermedad de Chagas, págs. 79-93. Editado por: R.J. Madoery, C. Madoery, M.I. Cámara.

Andrade ZA, Rocha Silva HR. 1995. Parasitism of adipocytes by Trypanosoma cruzi. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 90:521-522.

Antunes Teixeira VP, Mahler Araújo MB, dos Reis MA, dos Reis L, Silveira SA, Pinto Rodrigues ML, Franquini, jr J. 1994. Possible role of an adrenal parasite reservoir in the pathogenesis of chronic Trypanosoma cruzi myocarditis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 87:552-554.

Araujo FG. 1985. Trypanosoma cruzi: expression of antigens on the membrane surface of parasitized cells. *J. Immunol.*, 135:4149-4154.

Asahi I, Kawabata M, Moribayashi A, Okumura H. 1986. Cytotoxic factors towards neuroblastoma cells in trypomastigotes of Trypanosoma cruzi. Can. J. Microbiol., 32:711-718.

Aune TM, Pogue SL. 1989. Generation and characterization of continuous lines of CD8⁺ suppressor T lymphocytes. J. Immunol., 142:3731-3739.

Baumstark JS, Laffin RJ, Bradwil WA. 1964. A preparative method for the separation of 7s gamma-globulin from human serum. Arch. Biochem. Biophys., 108:514-522.

Beltz LA, Szein MB, Kierszenbaum F. 1988. Novel mechanism of Trypanosoma cruzi-induced suppression of human lymphocytes. Inhibition of IL-2 receptor expression. J. Immunol., 141:289-294.

Ben Younes-Chenouffi A, Said G, Eisen H, Durand A, Hontebeyrie-Joskowicz M. 1988. Cellular immunity to Trypanosoma cruzi is mediated by helper T cells (CD4⁺). Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 82:84-89.

Ben-Nun A, Cohen IR. 1982. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) mediated by T cell lines: process of selection of lines and characterization of the cells. J. Immunol., 129:303-308.

Benavente OR, Ledesma Patiño O, Báez Peña L, Lugones H, KalalaE, Ribas Meneclier C, Genovese O, Sica REP. 1989. Motor unit involvement in human acute Chagas' disease. Arq. Neuro-Psiquiat., 47:283-286.

Billiau A. 1996. Interferon- γ : biology and role in pathogenesis. Adv. Immunol., 62:61-130.

Bonay P, Fresno M. 1995. Characterization of carbohydrate binding proteins in Trypanosoma cruzi. J. Biol. Chem. 270:11062-11070.

Bonecini-Almeida MG, Galvao-Castro B, Ribeiro Pessoa MH, Pirmez C, Laranja F. 1990. Experimental Chagas' disease in rhesus monkeys. I. Clinical, parasitological, hematological and anatomic-pathological studies in the acute and indeterminate phase of the disease. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 85:163-171.

Borst J, Alexander S, Elder J, Terhorst C. 1983. The T3 complex on human T lymphocytes involves four structurally distinct glycoproteins. J. Biol. Chem. 258:5135-5141.

Caux C, Massacrier C, Dezutter-Dambuyant C, Vanbervliet B, Jacquet C, Schmitt D, Banchereau J. 1995. Human dendritic Langerhans cells generated *in vitro* from CD34+ progenitors can prime naive CD4+ T cells and process soluble antigen. *J. Immunol.*, 155:5427-5435.

Cavalleco R, Pereira ME. 1988. Antibody to Trypanosoma cruzi neuraminidase enhances infection *in vitro* and identifies a subpopulation of trypomastigotes. *J. Immunol.*, 140:617-625.

Celentano AM. 1996. Trypanosoma cruzi: Papel de los macrófagos en la infección experimental del ratón producida por poblaciones parasitarias con diferente capacidad para inducir respuesta inmune. Tesis, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

Celentano AM, González Cappa SM. 1992. Induction of macrophage activation and opsonizing antibodies by Trypanosoma cruzi subpopulations. *Parasite Immunol.*, 14:155-167.

Cetron MS, Basilio FP, Moraes AP, Sousa AQ, Paes JN, Kahn SJ, Wener MH, Van Voorhis WC. 1993. Humoral and cellular immune response of adults from northeastern Brazil with chronic Trypanosoma cruzi infection: depressed cellular immune response to T.cruzi antigen among Chagas' disease patients with symptomatic versus indeterminate infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 49:370-382.

Cohen IR, Holoshitz J, Van Eden W, Frenkel A. 1985. T lymphocyte clones illuminate pathogenesis and affect therapy of experimental arthritis. *Arthritis Rheum.*, 28:841-845.

Cossio PM, Diez C, Szarfman A, Kreutzer E, Candiolo B, Arana RM. 1974. Chagasic cardiomyopathy. Demonstration of a serum gamma globulin factor which reacts with endocardium and vascular structures. *Circulation*, 49:13-21.

Cunningham DS, Kuhn RE, Rowland EC. 1978. Suppression of humoral responses during Trypanosoma cruzi infections in mice. *Infect. Immun.*, 22:155-160.

Chesnut RW, Grey HM. 1981. Studies on the capacity of B cells to serve as antigen-presenting cells. *J. Immunol.*, 126:1075-1079.

Chiari W, Tafuri WL, Bambirra EA, Rezende MM, Ribeiro TO, Castro LP, Salgado JA, Amaral de Padua RA. 1980. The rabbit as a laboratory animal for studies on Chagas disease. Research note. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 22:207-208.

Chikunguwo SM, Kanazawa T, Dayal Y, Stadecker MJ. 1991. The cell mediated response to schistosomal antigens at the clonal level: in vivo functions of cloned murine egg antigen-specific CD4⁺ T helper type I lymphocytes. *J. Immunol.*, 147:3921-3925.

D'avila Reis D, Jones EM, Tostes S, Reis Lopez S, Chapadeiro E, Gazzinelli G, Colley D, McCurley TL. 1993a. Expression of major histocompatibility complex antigens and adhesion molecules in hearts of patients with chronic Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 49:192-200.

D'Avila Reis D, Jones EM, Tostes Jr. S, Reis Lopes E, Gazzinelli G, Colley DG, McCurley TL. 1993b. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor- α ⁺ cells and dominance of granzyme A⁺, CD8⁺ lymphocytes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 48:637-644.

de Souza MM, Andrade SG, Barbosa Jr AA, Macedo Santos RT, Avancini Ferreira Alves V, Andrade ZA. 1996. Trypanosoma cruzi strains and autonomic nervous system pathology in experimental Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 91:217-224.

De Souza W. 1984. Cell biology of Trypanosoma cruzi. *Int. Rev. Cytol.*, 86:197.

D'Imperio Lima MR, Joskowicz M, Coutinho A, Kipnis T, Eisen H. 1985. Very large and isotypically atypical polyclonal plaque-forming cell responses in mice infected with Trypanosoma cruzi. *Eur. J. Immunol.*, 15:201-213.

D'Imperio Lima MR, Eisen H, Minoprio P, Joskowicz M, Coutinho A. 1986. Persistence of polyclonal B cell activation with undetectable parasitemia in late stages of experimental Chagas' disease. *J. Immunol.*, 137:353-356.

Dvorak JA. 1975. New *in vitro* approach to the quantitation of Trypanosoma cruzi-vertebrate cell interactions. En: *New approaches in American trypanosomiasis research*, págs. 109-120. PAHO/WHO Scientific Publication No. 318.

Eksi S, Wassom DL, Powell MR. 1996. Host genetics and resistance to acute Trypanosoma cruzi infection in mice: profiles and compartmentalization of IL-2, -4, -5, -10, and IFN- γ -producing cells. *J. Parasitol.*, 82:59-65.

Factor SM, Cho S, Wittner M, Tanowitz H. 1985. Abnormalities of the coronary microcirculation in acute murine Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 34:246-253.

Felix JC, Von Kreuter BF, Santos-Buch CA. 1993. Mimicry of heart cell surface epitopes in primary anti-Trypanosoma cruzi Lyt2⁺ T lymphocytes. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 68:141-146.

Fife Jr. EH. 1977. Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi. En: Parasitic protozoa. Vol I: Taxonomy, kinetoplastids, and flagellates of fish, págs. 135-173. Editado por Julius P. Kreier. Academic Press.

Fiorentino DF, Zlotnick A, Vieira P, Mossman TR, Howard M, Moore K, O'Garra A. 1991. IL-10 acts on antigen-presenting cells to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J. Immunol.*, 146:3444-3451.

Freilij H, Müller LA, González Cappa SM. 1983. Direct micromethod for diagnosis of acute and congenital Chagas' disease. *J. Clin. Microbiol.*, 18:327-330.

García ES, Azambuja P. 1991. Development and interactions of Trypanosoma cruzi within the insect vector. *Parasitology Today*, 7:240-244.

Germain RN. 1993. The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation. *Ann. Rev. Immunol.*, 11:403-450.

Giordano R, Chammas R, Veiga SS, Colli W, Alves MJ. 1994. An acidic component of the heterogeneous Tc-85 protein family from the surface of Trypanosoma cruzi is a laminin binding glycoprotein. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 65:85-94.

González Cappa SM, Isola ED de. 1994. Agente etiológico: Trypanosoma cruzi. En: Enfermedad de Chagas, págs. 31-40. R. Storino y J. Milei. Ed. Doyma Argentina S.A..

González Cappa SM, Chiale P, del Prado GE, Katzin AM, Wynne de Martini Gj, Isola ELD, Abramo Orrego L, Segura EL. 1980. Aislamiento de una cepa de Trypanosoma cruzi de un paciente con miocardiopatía chagásica crónica y su caracterización biológica. *Medicina (Bs. As.)*, 40 (Supl. 1):63-68.

González Cappa SM, Bijovsky T, Freilij H, Müller L, Katzin AM. 1981. Aislamiento de una cepa de Trypanosoma cruzi a predominio de formas delgadas en la Argentina. Medicina (Bs. As.), 41:119-120.

González Cappa SM, Sanz OP, Müller LA, Molina HA, Fernandez J, Rimoldi MT, Sica REP. 1987. Peripheral nervous system damage in experimental chronic Chagas' disease. Am. J. Trop. Med. Hyg., 36:41-45.

Griffiths GM, Mueller C. 1991. Expression of perforin and granzymes in vivo: potential diagnostic markers for activated cytotoxic cells. Immunol. Today, 12:415-419.

Guesdon J-L, Ternynck T, Avrameas S. 1979. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. J. Histochem. Cytochem., 27:1131-1139.

Gürtler RE. 1987. Estudios sobre la transmisión del Trypanosoma cruzi a niños y perros en un área rural, con énfasis en el rol de los reservorios caninos: un seguimiento de dos años. Tesis, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Harel-Bellan A, Joskowicz M, Fradelizi D, Eisen H. 1983. Modification of T-cell proliferation and interleukin-2 production in mice infected with Trypanosoma cruzi. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:3466-3469.

Harel-Bellan A, Joskowicz M, Fradelizi D, Eisen H. 1985. T lymphocyte function during experimental Chagas' disease: production of and response to interleukin 2. Eur. J. Immunol., 15:438-442.

Hartung HP, Heininger K, Schäfer B, Fierz W, Toyka KV. 1988. Immune mechanisms in inflammatory polyneuropathy. En: Advances in neuroimmunology. Editado por: CS Raine. Ann. N.Y. Acad. Sci. (USA), 540:122-161.

Hatcher FM, Kuhn RE. 1982. Destruction of Trypanosoma cruzi by natural killer cells. Science, 218:295-296.

Hauschka T. 1947. Sex of host as a factor in Chagas' disease. J. Parasitol. 33:399-404.

- Herrera EM, Ming M, Ortega-Barria E, Pereira ME. 1994. Mediation of Trypanosoma cruzi invasion by heparan sulfate receptors on host cells and penetrin counter-receptors on the trypanosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 65:73-83.
- Holoshitz J, Naparstek Y, Ben-Nun A, Cohen IR. 1983. Lines of T lymphocytes induce or vaccinate against autoimmune arthritis. *Science*, 219:56-58.
- Hontebeyrie-Joskowicz M, Said G, Milon G, Marchal G, Eisen H. 1987. L3T4⁺ T cells able to mediate parasite-specific delayed type hypersensitivity play a role in the pathology of experimental Chagas' disease. *Eur. J. Immunol.*, 17:1027-1033.
- Israelski DM, Sadler R, Araujo FG. 1988. Antibody response and antigen recognition in human infection with Trypanosoma cruzi. *Am. J. trop. Med. Hyg.*, 39:445-455.
- James SL, Kipnis TL, Sher A, Hoff R. 1982. Enhanced resistance to acute infection with Trypanosoma cruzi in mice treated with an interferon inducer. *Infect. Immun.*, 35:588-593.
- Jenkins MK, Johnson JG. 1993. Molecules involved in T-cell costimulation. *Curr. Opin. Immunol.* 5:361-367.
- Jenne DE, Tschopp J. 1988. Granzymes, a family of serine proteases released from granules of cytolytic T lymphocytes upon T cell receptor stimulation. *Immunol. Rev.*, 103:53-71.
- Johnson GD, Holborow WJ, Dorling J. 1978. Immunofluorescence and immunoenzyme techniques. En: *Handbook of experimental immunology*, Vol. I, capítulo 15. Editado por: D.M. Weir. Blackwell, Oxford.
- Kaufmann SHE, Hug E, De Libero G. 1986. Listeria monocytogenes-reactive T lymphocyte clones with cytolytic activity against infected targets. *J. Exp. Med.* 164:363-368.
- Kazatchkine MD, Fearon DT, Austen KF. 1979. Human alternative complement pathway: membrane associated sialic acid regulates the competition between B and β 1H for cell bound C3b. *J. Immunol.*, 122:75-81.
- Kierszenbaum F. 1986. Autoimmunity in Chagas' disease. *J. Parasitol.*, 72:201-211.

Kierszenbaum F, Pienkowski M. 1979. Thymus-dependent control of host defence mechanisms against Trypanosoma cruzi. Infect. Immun., 24:117-120.

Kierszenbaum F, Stiles B. 1985. Evidence supporting the existence of a host cell surface receptor for Trypanosoma cruzi. J. Protozool., 32:364-366.

Kierszenbaum F, Cuna WR, Beltz LA, Szein MB. 1989. Trypanosoma cruzi reduces the number of high-affinity IL-2 receptors on activated human lymphocytes by suppressing the expression of the p55 and p70 receptor components. J. Immunol., 143:275-279.

Kierszenbaum F, Cuna WR, Beltz LA, Szein MB. 1990. A secretion product(s) of Trypanosoma cruzi that inhibits proliferation and IL-2 receptor expression by activated human peripheral blood mononuclear cells. J. Immunol., 144:4000-4004.

Kierszenbaum FJ, Ivanyi J, Budzko DB. 1976. Mechanism of natural resistance to trypanosomal infection. Role of complement in avian resistance to Trypanosoma cruzi infection. Immunology, 30:1-6.

Kierszenbaum F, Mejía López H, Szein MB. 1996. Trypanosoma cruzi downregulates the production of interleukin-2, interferon- γ , interleukin-4 and interleukin-5 by activated human lymphocytes. J. Parasitol., 82:652-656.

King PD, Katz DR. 1990. Mechanisms of dendritic cell function. Immunology Today, 11:206-211.

Knight SC, Stagg AJ. 1993. Antigen presenting cell types. Curr. Opin. Immunol., 5:374-382.

Köberle F. 1974. Pathogenesis of Chagas' disease. En: Trypanosomiasis and leishmaniasis with special reference to Chagas' disease, págs. 137-158. Ciba Foundation Symposium Series No. 20, Amsterdam.

Krettli AU, Carrington PW, Nussenzweig RS. 1979. Membrane-bound antibodies to blood-stream T.cruzi in mice: strains differences in susceptibility to complement mediated lysis. Clin. Exp. Immunol., 37:416-423.

Krieger JJ, Grammer SF, Grey HM, Chesnut RW. 1985. Antigen presentation by splenic B cells: resting B cells are ineffective, whereas activated B cells are effective accessory cells for T cell responses. *J. Immunol.*, 135:2937-2945.

Kurstak E. 1986. Enzyme immunohistochemical methods. En: enzyme immunodiagnosis, págs. 55-69, Academic Press, USA.

Laguens RP, Cabeza Meckert PM, Gelpi RL. 1980. Infección crónica del ratón con *Trypanosoma cruzi*. Modelo experimental de enfermedad de Chagas. *Medicina (Bs. As.)*, 40:33-39.

Lawrie RA. 1952. Biochemical differences between red and white muscle. *Nature (London)*, 170:122-123.

Ledbetter JA, Rouse RV, Spedding Mickelm H, Herzenberg LA. 1980. T cell subsets defined by the expression of Lyt-1,2,3 and Thy-1 antigens. Two parameter immunofluorescence and cytotoxicity assays with monoclonal antibodies modifies current views. *J. Exp. Med.*, 152:280-295.

Ledbetter JA, Evans RL, Lipinski M, Cunningham-Rundles C, Good RA, Herzenberg LA. 1981. Evolutionary conservation of surface molecules that distinguish T lymphocyte helper/inducer and cytotoxic/suppressor subpopulations in mouse and man. *J. Exp. Med.*, 153:310-323.

Lederman S, Yellin MJ, Krichevsky A, Belko J, Lee JJ, Chess L. 1992. Identification of a novel surface protein on activated CD4⁺ T cells that induces contact dependent B cell differentiation (help). *J. Exp. Med.*, 175:1091-1101.

Lee JJ, Hutner SH. 1985. Kinetoplastida. En: An illustrated guide to the protozoa, págs. 141-155. Editado por Lee JJ, Hutner SH y Bovee EC. Society of Protozoologists, Lawrence, Kansas, Estados Unidos.

Lehmann-Grube F, Moskophidis D, Löhler J. 1988. Recovery from acute virus infection. Role of cytotoxic T cells in the elimination of lymphocytic choriomeningitis virus from spleens of mice. En: Cytotoxic T cells. Biology and relevance to disease. Editado por: JR Battisto, J Plate y G Shearer. *Ann. N. Y. Acad. Sci. (USA)*, 532:238-256.

Leite de Moraes MC, Hontebeyrie-Joskowicz M, Leboulenger F, Savino W, Dardenne M, Lepault F. 1991. Studies on the thymus in Chagas' disease. II. Thymocyte subset fluctuations in Trypanosoma cruzi-infected mice: relationship to stress. *Scand. J. Immunol.*, 33:267-275.

Levin MJ, Mesri EA, Benarous R, Levitus G, Schijman A, Levi-Yeyati P, Chiale P, Ruiz A, Kahn A, Rosembaum MB, Torres HN, Segura EL. 1989. Identification of major Trypanosoma cruzi antigenic determinants in chronic Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 41:530-539.

Levitus G, Van Regenmortel MHV, Hontebeyrie-Joskowicz M, Levin MJ. 1991. Humoral autoimmune response to ribosomal P proteins in chronic Chagas' heart disease. *Clin. Exp. Immunol.*, 85:413-417.

Lewis DH. 1975. Ultrastructural study from promastigotes of reptiles. *J. Protozool.*, 22:344-352.

Liew FY, Scott MT, Liu DS, Croft SL. 1987. Suppressive substance produced by T cells from mice chronically infected with Trypanosoma cruzi. I. Preferential inhibition of the induction of delayed-type hypersensitivity. *J. Immunol.*, 139:2452-2457.

Lindstrom JM, Seybold ME, Lennon VA, Wittingham S, Duane DD. 1976. Antibody to acetylcholine receptor in myasthenia gravis: prevalence, clinical correlates, and diagnostic value. *Neurology*, 26:1054-1059.

Losavio A, Jones MC, Sanz OP, Mirkin G, González Cappa SM, Muchnik S, Sica REP. 1989. A sequential study of the peripheral nervous system involvement in experimental Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 41:539-547.

Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr LA, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-275.

Lu CY, Unanue ER. 1982. Ontogeny of murine macrophages: Functions related to antigen presentation. *Infect. Immun.*, 36:169-175.

Lugones H, Ledesma O, Storino R., Marteleur A, Ribas Meneclier C, Barbieri G. 1994. Chagas agudo. En: *Enfermedad de Chagas*, págs. 209-234. R. Storino y J. Milei. Ed. Doyma Argentina S.A..

Marchalonis JJ, Schluter SF. 1994. Development of an immune system. En: Primordial immunity. Foundations for the vertebrate immune system. Ann. N.Y. Acad. Sci. USA, 712:1-12. Editado por G. Beck, E.L. Cooper, G.S. Habicht y, J.J. Marchalonis.

Maron R, Zerubavel R, Friedman A, Cohen IR. 1983. T lymphocyte line specific for thyroglobulin produces or vaccinates against autoimmune thyroiditis in mice. J. Immunol., 131:2316-2322.

Martins MS, Hudson L, Krettli AU, Cançado JR, Brener Z. 1985. Human and mouse sera recognize the same polypeptide associated with immunological resistance to Trypanosoma cruzi infection. Clin. Exp. Immunol., 61:343-350.

Melo RC, Brener Z. 1978. Tissue tropism of different Trypanosoma cruzi strains. J. Parasitol., 64:475-482.

Mesri EA, Levitus G, Hontebeyrie-Joskowicz M, Dighiero G, Van Regenmortel MHV, Levin MJ. 1990. Major T.cruzi antigenic determinant in Chagas' heart disease shares homology with the systemic lupus erythematosus ribosomal P protein epitope. J. Clin. Microbiol., 28:1219-1224.

Ming M, Ewen ME, Pereira ME. 1995. Trypanosome invasion of mammalian cells requires activation of the TGF beta signaling pathway. Cell, 82:287-296.

Minoprio P. 1991. Chagas' disease: CD5 B-cell-dependent Th2 pathology?. Res. Immunol., 142:137-140.

Minoprio PM, Eisen H, Forni L, d'Imperio Lima MR, Joskowicz M, Coutinho A. 1986a. Polyclonal lymphocyte responses to murine Trypanosoma cruzi infection. I. Quantitation of both T- and B-cell responses. Scand. J. Immunol., 24:661-668.

Minoprio P, Coutinho A, Joskowicz M, D'Imperio Lima MR, Eisen H. 1986b. Polyclonal lymphocyte responses to murine Trypanosoma cruzi infection. II. Cytotoxic T lymphocytes. Scand. J. Immunol., 24:669-679.

Minoprio P, Eisen H, Joskowicz M, Pereira P, Coutinho A. 1987. Suppression of polyclonal antibody production in Trypanosoma cruzi-infected mice by treatment with anti-L3T4 antibodies. J. Immunol., 139:545-550.

Minoprio P, Bandeira A, Pereira P, Motas-Santos TA, Coutinho A. 1989. Preferential expansion of Ly1-B and CD4⁺ CD8⁺ T cells in the polyclonal lymphocyte responses to murine Trypanosoma cruzi infection. *Int. Immunol.*, 1:176-184.

Minoprio P, Cury El Cheikh M, Ross D, Coutinho A, Eisen H, Hontebeyrie-Joskowicz M. 1991. Chagas' disease: consequence of unbalanced immune system. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 86 (Supl. 1):39-40.

Mirkin GA, Jones M, Sanz OP, Rey R, Sica REP, González Cappa SM. 1994. Experimental Chagas' disease: electrophysiology and cell composition of the neuromyopathic inflammatory lesions in mice infected with a myotropic and a pantropic strain of Trypanosoma cruzi. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 73:69-79.

Mirkin GA, Celentano AM, Jones M, Malchiodi E, González Cappa SM. 1996. Distinct T cell subsets promotes neuromyopathic damage in mice infected with different Trypanosoma cruzi strains. Manuscrito remitido para su publicación.

Mishell BB, Mishell RI, Shiigi JM. 1980. Adherence. Sephadex G-10. En: *Selected methods in cellular immunology*, págs. 175-179. B.B. Mishell y S.M. Shiigi, Editores. WH Freeman & Co., San Francisco, USA.

Molina HA. 1989. Patología neuromuscular en la enfermedad de Chagas experimental. Tesis. Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Molina HA, Kierszenbaum F. 1988. Kinetics of development of inflammatory lesions in myocardial and skeletal muscle in experimental Trypanosoma cruzi infection. *J. Parasitol.*, 74:370-374.

Molina HA, Cardoni RL, Rimoldi MT. 1987. The neuromuscular pathology of experimental Chagas' disease. *J. Neurol. Sci.*, 81:287-300.

Molina HA, Milei J, Rimoldi MT, González Cappa SM, Storino RA. 1988. Histopathology of the heart conducting system in experimental Chagas disease. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 82:241-246.

Moll H, Fuchs H, Blank C, Rollinghoff M. 1993. Langerhans cells transport *Leishmania major* from the infected skin to the draining lymph nodes for presentation to antigen-specific T cells. *Eur. J. Immunol.*, 23:1595-1601.

Morrison LA, Luckacher AE, Braciale VL, Fan DB, Braciale TJ. 1986. Differences in antigen presentation to MHC class I- and class II- restricted influenza virus-specific cytolytic T lymphocyte clones. *J. Exp. Med.*, 163:903-921.

Mortatti RC, Fonseca LS, Coelho J, Oliveira A, Moreno M. 1992. Follow-up of patent and subpatent parasitemias and development of muscular lesions in mice inoculated with very small numbers of *Trypanosoma cruzi*. *Exp. Parasitol.*, 75:233-239.

Moser DR, Kirchhoff LV, Donelson JE. 1989. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, 27:1477-1482.

Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to the profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.*, 136:2348-2356.

Müller LA, González Cappa SM. 1985. *Trypanosoma cruzi*: Diferencias en el requerimiento de protectores proteicos presentadas por dos cepas argentinas. *Rev. Arg. Microbiol.*, 17:59-60.

Müller LA, González Cappa SM. 1987. Immunogenicity of *Trypanosoma cruzi* strains determined by neutralization test. *Rev. Arg. Microbiol.*, 19:101-108.

Müller LA, Añasco N, González Cappa SM. 1986. *Trypanosoma cruzi*: Isolate dependence in the induction of lytic antibodies in the mouse and the rabbit. *Exp. Parasitol.*, 61:284-293.

Nagata M, Santamaría P, Kawamura T, Utsugi T, Yoon J-W. 1994. Evidence for the role of CD8⁺ cytotoxic T cells in the destruction of pancreatic β -cells in NOD mice. *J. Immunol.*, 152:2042-2050.

Naparstek Y. 1993. The role of autoantibodies in autoimmune disease. *Ann. Rev. Immunol.*, 11:79-104.

- Nathan C, Nogueira N, Juangbhanich C, Ellis J, Cohn Z. 1979. Activation of macrophages *in vivo* and *in vitro*. Correlation between hydrogen peroxide release and killing of Trypanosoma cruzi. J. Exp. Med. 149:1056-1068.
- Neva FA, Malone MF, Myers BR. 1961. Factors influencing the intracellular growth of Trypanosoma cruzi in vitro. Am. J. Trop. Med. Hyg., 10:140-154.
- Nickell SP, Stryker GA, Arevalo C. 1993. Isolation from Trypanosoma cruzi-infected mice of CD8⁺, MHC-restricted cytotoxic T cells that lyse parasite-infected target cells. J. Immunol., 150:1446-1457.
- O'Garra A, Chang R, Go N, Hastings R, Haughton G, Howard M. 1992. Ly-1 B cells are the main source of B-cell derived IL-10. Eur. J. Immunol., 22:711-717.
- Oliveira JSM. 1985. A natural model of intrinsic heart nervous system denervation: Chagas' cardiopathy. Am. Heart J., 110:1092-1098.
- Oliveira JSM, Correa de Araujo RR, Navarro MA, Muccillo G. 1983. Cardiac thrombosis and tromboembolism in chronic Chagas' heart disease. Am. J. Cardiol., 52:147-151.
- Orosz CG, Zinn NE, Sirinek L, Ferguson RM. 1986. In vivo mechanisms of alloreactivity. Transplantation, 41:75-83.
- Ortega-Barria E, Pereira M. 1991. A novel T.cruzi heparin-binding protein promotes fibroblast adhesion and penetration of engineered bacteria and trypanosomes into mammalian cells. Cell, 67:411-421.
- Palacios-Prü E, Carrasco H, Scorza C, Espinoza R. 1989. Ultrastructural characteristics of different stages of human chagasic myocarditis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 41:29-40.
- Paulin JJ, Keith CH, Tarleton RL. 1988. A monoclonal antibody to alpha tubulin recognizes host cell and Trypanosoma cruzi tubulin. J. Protozool. 35:123-129.
- Petray P, Rottenberg ME, Grinstein S, Orn A. 1994. Release of nitric oxide during the experimental infection with Trypanosoma cruzi. Parasite Immunol., 16:193-199.

Plasman N, Guillet J-G, Vray V. 1995. Impaired protein catabolism in Trypanosoma cruzi-infected macrophages: possible involvement in antigen presentation. *Immunology*, 86:636-645.

Podack ER, Lowrey DM, Lichtenheld M, Hameed A. 1988. Function of granule perforin and esterases in T cell-mediated reactions. Components required for delivery of molecules to target cells. En: Cytotoxic T cells. Biology and relevance to disease. Editado por: JR Battisto, J Plate y G Shearer. Ann. N.Y. Acad. Sci. (USA), 532:292-302.

Postan M, Dvorak JA, Mc Daniel JP. 1983. Studies of Trypanosoma cruzi clones in inbred mice. I. A comparison of the course of infection in C3H/HeN mice with two clones isolated from a common source. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32:497-506.

Postan M, Mc Daniel JP, Dvorak JA. 1984. Studies of Trypanosoma cruzi clones in inbred mice. II. Course of infection of C57Bl/6 mice with single-cell isolated stocks. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 33:236-238.

Rammensee H-G, Falk K, Rötzschke O. 1993. MHC molecules as peptide receptors. *Curr. Opin. Immunol.*, 5:35-44.

Rezende JM de, Luquetti AO. 1994. Chagasic megavisceras. En: Chagas' disease and the nervous system, págs. 149-171. PAHO/WHO Scientific Publication No. 547.

Ribeiro dos Santos R, Hudson L. 1980. Trypanosoma cruzi: binding of parasite antigens to mammalian cell membranes. *Parasite Immunol.*, 2:1-10.

Ribeiro dos Santos R, Hudson L. 1981. Denervation and the immune response in mice infected with Trypanosoma cruzi. *Clin. Exp. Immunol.*, 44:349-354.

Ribeiro dos Santos R, Rossi MA, Laus JL, Santana Silva J, Savino W, Mengel J. 1992. Anti-CD4 abrogates rejection and reestablishes long-term tolerance to syngeneic newborn hearts grafted in mice chronically infected with Trypanosoma cruzi. *J. Exp. Med.*, 175:29-39.

Roberson EL, Hanson WL, Chapman Jr. WL. 1973. Trypanosoma cruzi: effects of anti-thymocyte serum in mice and neonatal thymectomy in rats. *Exp. Parasitol.*, 34:168-180.

Romeiro SA, Takehara HA, Mota I. 1984. Isotype of lytic antibodies in serum of Chagas' disease patients. Clin. Exp. Immunol., 55:413-418.

Rose NR, Bona C. 1993. Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited). Immunol. Today, 14:426-430.

Rosenbaum MB. 1964. Chagasic cardiomyopathy. Prog. Cardiovasc. Dis., 7:199-225

Rossi MA, Carobrez SG. 1985. Experimental Trypanosoma cruzi cardiomyopathy in Balb/c mice: histochemical evidence of hypoxic changes in the myocardium. Br. J. Exp. Pathol. 66:155-160.

Rowland EC, Lozykowski MG, McCormick TS. 1992. Differential cardiac histopathology in inbred mouse strains chronically infected with Trypanosoma cruzi. J. Parasitol., 78:1059-1066.

Russo M, Starobinas N, Minoprio P, Coutinho A, Hontebeyrie-Joscowicz M. 1988. Parasitic load increases and myocardial inflammation decreases in Trypanosoma cruzi-infected mice after inactivation of helper cells. Ann. Inst. Pasteur/Immunol., 139:225-236.

Sadigursky M, Acosta AM, Santos-Buch CA. 1982. Muscle sarcoplasmic reticulum antigen shared by a Trypanosoma cruzi clone. Am. J. Trop. Med. Hyg., 31:934-941.

Said G, Joskowicz M, Antunes Barreira A, Eisen H. 1985. Neuropathy associated with experimental Chagas' disease. Ann. Neurol., 18:676-683.

Sakaguchi S, Sakaguchi N. 1990. Thymus and autoimmunity: Capacity of the normal thymus to produce pathogenic self-reactive T cells and conditions required for their induction of autoimmune disease. J. Exp. Med., 172:537-545.

Salgame P, Convit J, Bloom BR. 1991. Immunological suppression by human CD8⁺ T cells is receptor dependent and HLA-DQ restricted. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:2598-2602.

Sánchez DO, González Cappa SM. 1983. Neutralizing antibodies in Trypanosoma cruzi infection. Medicina (Bs. As.), 43:41-46.

Sanz OP, Sica REP, Colombi A, O'Neill E, Pagano M, Aristimuño G. 1977. Despoblación de neuronas motoras alfa en la enfermedad de Chagas crónica. Medicina (Bs. As.), 37:551-552.

Sanz OP, Aristimuño GG, Ratusnu AF, O'Neill EM, Sica REP. 1978. An electrophysiological investigation of skeletal muscle in human chronic Chagas' disease. *Arq. Neuro-psiquiat.* 36:319-326.

Sanz OP, Cardoni RI, Celentano AM, Rimoldi MT, Sica REP, González Cappa SM. 1991. Trypanosoma cruzi: inducción de alteraciones del sistema nervioso periférico en diferentes cepas de ratones. *Rev. Arg. Microbiol.*, 23:30-34.

Satoh J-I, Koike F, Tabira T. 1988. Experimental allergic encephalomyelitis mediated by murine encephalitogenic T-cell lines specific for myelin proteolipid apoprotein. En: *Advances in neuroimmunology*. Editado por: CS Raine. *Ann. N.Y. Acad. Sci. (USA)*, 540:343-344.

Scorza C, Scorza JV. 1972. Acute myocarditis in rats inoculated with Trypanosoma cruzi: study of animals sacrificed between the fourth and twentieth day after inoculation. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 14:171-177.

Scott MT, Goss-Sampson M. 1984. Restricted IgG isotype profiles in T.cruzi infected mice and Chagas' disease patients. *Clin. Exp. Immunol.*, 58:372-379.

Schenkman RPS, Vandekerckhove F, Schenkman S. 1993. Mammalian cell sialic acid enhances Trypanosoma cruzi invasion. *Infect. Immun.* 61: 898-902.

Schenkman S, Eichinger D. 1993. Trypanosoma cruzi trans-sialidase and cell invasion. *Parasitology Today*, 9:218-222.

Schenkman S, Jiang MS, Hart GW, Nussenzweig V. 1991. A novel cell surface trans-sialidase of Trypanosoma cruzi generates a strain-specific epitope required for invasion of mammalian cells. *Cell*, 65:1117-1125.

Schmuñis GA, González Cappa SM, Traversa OC, Yanovsky JF. 1971. The effects of immunodepression due to neonatal thymectomy in infection with Trypanosoma cruzi in mice. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 65:89-94.

Sher A, Coffman RL. 1992. Regulation of immunity to parasite by T cells and T cell-derived cytokines. *Ann. Rev. Immunol.*, 10:385-409.

Sica REP. 1994. Alterations in the peripheral and central nervous systems in Chagas' disease. En: Chagas' disease and the nervous system, págs. 172-188. PAHO/WHO Scientific Publication No. 547.

Sica REP, Sanz OP, Aristimuño GG, Basso S, Pagano MA, Taratuto AL, Fumo T, Ratusnu AF, Colombi A. 1979. Muscle denervation in chronic Chagas disease. *Medicina (Bs. As.)*, 39:579-588.

Sica REP, Filipini D, Panizza M, Fumo T, Basso S, Lázari J, Molina HA. 1986. Involvement of peripheral sensory system in human chronic Chagas disease. *Medicina (Bs. As.)*, 46:662-668.

Sica REP., González Cappa SM, Sanz OP, Mirkin G. 1995. Peripheral nervous system involvement in human and experimental chronic American trypanosomiasis. *Bull. Soc. Path. Ex.*, 88:155-163.

Sinha AA, López MT, Mc Devitt HO. 1990. Autoimmune diseases: The failure of self tolerance. *Science*, 248:1380-1388.

Smith HR, Steinberg AD. 1983. Autoimmunity - A perspective. *Ann. Rev. Immunol.*, 1:175-210.

Smith HR, Chused TM, Smathers P, Steinberg AD. 1983. Evidence for thymic regulation of autoimmunity in BXSb mice: Acceleration of disease by neonatal thymectomy. *J. Immunol.*, 130:1200-1204.

Snary D, Flint JE, Wood JN, Scott MT, Chapman MD, Dodd J, Jessell TM, Miles MA. 1983. A monoclonal antibody with specificity for *Trypanosoma cruzi*, central and peripheral neurones and glia. *Clin. Exp. Immunol.*, 54:617-624.

Soong L, Tarleton RL. 1992. Selective suppressive effects of *Trypanosoma cruzi* infection on IL-2, c-myc, and c-fos gene expression. *J. Immunol.*, 149:2095-2102.

Starobinas N, Russo M, Minoprio P, Hontebeyrie-Joskowicz M. 1991. Is TNF α involved in early susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected C3H/He mice. *Res. Immunol.*, 142:117-122.

Storino R. 1994. Chagas crónico. En: Enfermedad de Chagas, págs. 247-266. R. Storino y J. Milei. Ed. Doyma Argentina S.A..

Strassman G, Bach FH. 1984. OKT4⁺ cytotoxic T cells can lyse targets via class I molecules and can be blocked by monoclonal antibodies against T4 molecules. *J. Immunol.*, 133:1705-1709.

Sun J, Tarleton RL. 1993. Predominance of CD8⁺ T lymphocytes in the inflammatory lesions of mice with acute Trypanosoma cruzi infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 48:161-169.

Szarfman A, Terranova VP, Rennard SI, Foidart JM, de Fátima Lima M, Scheinman JI, Martin GR. 1982. Antibodies to laminin in Chagas disease. *J. Exp. Med.*, 155:1161-1171.

Sztein MB, Cuna WR, Kierszenbaum F. 1990. Trypanosoma cruzi inhibits the expression of CD4, CD8 and IL-2R by mitogen-activated helper and cytotoxic human lymphocytes. *J. Immunol.*, 144:3558-3562.

Sztein MB, Kierszenbaum F. 1992. Suppression by Trypanosoma cruzi of T-cell receptor expression by activated human lymphocytes. *Immunology*, 77:277-283.

Sztein MB, Kierszenbaum F. 1993. Mechanisms of development of immunosuppression during Trypanosoma cruzi infection. *Parasitol. Today*, 9:424-428.

Taliaferro WH, Pizzi T. 1955. Connective tissue reactions in normal and immunized mice to a reticulotropic strain of Trypanosoma cruzi. *J. Inf. Dis.*, 96:199-226.

Taniguchi T. 1988. Regulation of cytokine gene expression. *Ann. Rev. Immunol.*, 6:439-464.

Tanowitz HB, Burns ER, Kumar Sinha A, Kahn NN, Morris SA, Factor SM, Hatcher VB, Bilezikian JP, Baum SG, Wittner M. 1990. Enhanced platelet adherence and aggregation in Chagas' disease: a potential pathogenic mechanism for cardiomyopathy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 43:274-281.

Taratuto A, Pagano MA, Fumo T, Sanz OP, Sica REP. 1978. Histological and histochemical changes of skeletal muscle in human chronic Chagas disease. *Arq. Neuro-Psiquiat.*, 36:327-331.

Tarleton RL. 1988a. Trypanosoma cruzi-induced suppression of IL-2 production. I. Evidence for the presence of IL-2-producing cells. J. Immunol., 140:2763-2768.

Tarleton RL. 1988b. Trypanosoma cruzi-induced suppression of IL-2 production. II. Evidence for a role of suppressor cells. J. Immunol., 140:2769-2773.

Tarleton RL. 1990. Depletion of CD8⁺ T cells increases susceptibility and reverses vaccine-induced immunity in mice infected with Trypanosoma cruzi. J. Immunol., 144:717-724.

Tarleton RL, Koller BH, Latour A, Postan M. 1992. Susceptibility of β_2 -microglobulin-deficient mice to Trypanosoma cruzi infection. Nature, 356:338-340.

Teixeira ARL, Martins Santana J. 1989. Trypanosoma cruzi: Endocytosis and degradation of specific antibodies by parasite forms. Am. J. Trop. Med. Hyg. 40:165-170.

Teixeira ARL, Teixeira G, Macedo V, Prata A. 1978. Acquired cell-mediated immunodepression in acute Chagas' disease. J. Clin. Invest., 62:1132-1141.

Teixeira ML, Dvorak JA. 1985. Histochemical characterization of parasitized skeletal muscle fibers. J. Protozool., 32:339-341.

Tekiel VS, Mirkin GA, González Cappa SM. 1996. Specific reactivity against homologous tissue is induced by different strains of Trypanosoma cruzi in a murine model of Chagas' disease. Manuscrito remitido para su publicación.

Tibayrenc M, Ward P, Moya A, Ayala FJ. 1986. Natural populations of Trypanosoma cruzi, the agent of Chagas' disease, have a complex multiclonal structure. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83: 115-119.

Towbin H, Rosenfelder G, Wieslander J, Avila JL, Rojas M, Szarfman A, Esser K, Nowack H, Timpl R. 1987. Circulating antibodies to mouse laminin in Chagas disease, American cutaneous leishmaniasis, and normal individuals recognize terminal galactosyl(α 1-3)-galactose epitopes. J. Exp. Med., 166:419-432.

Trischmann TM, Bloom BR. 1982. Genetics of murine resistance to Trypanosoma cruzi. Infect. Immun., 35:546-551.

- Trischmann TM, Tanowitz H, Wittner M, Bloom BR. 1978. Trypanosoma cruzi: role of the immune response in the natural resistance of inbred strains of mice. *Exp. Parasitol.*, 45:160-168.
- Van Voorhis WC, Eisen H. 1989. A surface antigen of Trypanosoma cruzi that mimics mammalian nervous tissue. *J. Exp. Med.*, 169:641-652.
- Van Voorhis WC, Schlekewy L, Trong HL. 1991. Molecular mimicry by Trypanosoma cruzi: the Fl-160 epitope that mimics mammalian nerve can be mapped to a 12-amino acid peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:5993-5997.
- Vattuone NH, González Cappa SM, Menes S, Schmuñis GA. 1974. Cell mediated and humoral immune response of mice infected with Trypanosoma cruzi. *Tropenmed. Parasit.*, 25:267-272.
- Verhagen AM, Kimpton WG, Nash AD. 1995. Recirculation of cytolytic T cells from a single lymph node during an immune response to allogeneic leukocytes. *Transplantation*, 59:432-435.
- Von Kreuter BF, Santos-Buch CA. 1986. Pathoimmune polymyositis induced in C3H/HeJ mice by Trypanosoma cruzi infection. *Clin. Exp. Rheumatol.*, 4:83-89.
- Walker WS. 1981. Separation of murine macrophages by adherence to solid substrates. En: *Methods for studying mononuclear phagocytes*, págs. 179-186. Academic Press, Inc.
- Webster P, Russell DG. 1993. The flagellar pocket of trypanosomatids. *Parasitology Today*, 9:201-206.
- Wekerle H, Schwab M, Linington C, Meyermann R. 1986. Antigen presentation in the peripheral nervous system: Schwann cells present endogenous myelin autoantigens to lymphocytes. *Eur. J. Immunol.*, 16:1551-1557.
- Wisniewsky HM, Keith AN. 1977. Chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis: An experimental model for multiple sclerosis. *Ann. Neurol.*, 1:144-148.

Wood JN, Hudson L, Jessell TM, Yamamoto M. 1982. A monoclonal antibody defining antigenic determinants on subpopulations of mammalian neurones and Trypanosoma cruzi parasites. *Nature*, 296:34-38.

Wrightsman R, Krassner S, Watson J. 1982. Genetic control of responses to Trypanosoma cruzi in mice: multiple genes influencing parasitemia and survival. *Infect. Immun.*, 36:637-644.

Zhang L, Tarleton RL. 1996. Characterization of cytokine production in murine Trypanosoma cruzi infection by *in situ* immunocytochemistry: lack of association between susceptibility and type 2 cytokine production. *Eur. J. Immunol.*, 26:102-109.